

N° D'ORDRE : 601

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

POUR OBTENIR

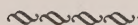
LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Régine MAGET-DANA

Ingénieur diplômé de l'Ecole Nationale Supérieure
de Chimie de Toulouse
Attachée de recherches au CNRS

L'ACIDE 2 - AMINOETHYLPHOSPHONIQUE : SON INCORPORATION DANS LES LIPIDES TISSULAIRES DE RAT ET SON ACTION SUR LE METABOLISME PHOSPHOLIPIDIQUE



Soutenue le 2 Mai 1974 devant la Commission d'Examen

MM. J. ASSELINEAU

Président

R. AGID

L. DOUSTE-BLAZY

P. MANDEL

E. NEUZIL

} Examinateurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546624_0009

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

POUR OBTENIR

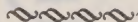
LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Régine **MAGET-DANA**

Ingénieur diplômé de l'Ecole Nationale Supérieure
de Chimie de Toulouse
Attachée de recherches au CNRS

L'ACIDE 2 - AMINOETHYLPHOSPHONIQUE : SON INCORPORATION DANS LES LIPIDES TISSULAIRES DE RAT ET SON ACTION SUR LE METABOLISME PHOSPHOLIPIDIQUE



Soutenue le 2 Mai 1974 devant la Commission d'Examen

MM. J. ASSELINEAU

Président

R. AGID

L. DOUSTE-BLAZY

P. MANDEL

E. NEUZIL

} Examineurs



UNIVERSITE PAUL SABATIER

TABLEAU DU PERSONNEL SCIENCES

DIRECTION DE L'UNIVERSITE

M. LARENG Président
M. MATHIS 1er Vice-Président
M. MARTIN 2ème Vice-Président

U.E.R. SCIENTIFIQUES

HONORARIAT

M. BEDOS Professeur honoraire
M. BLAIZOT Doyen honoraire
M. CAPDECOMME Doyen honoraire, Recteur honoraire correspondant de l'Institut
M. DIEHL Professeur honoraire
M. DUPOUY Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général honoraire du C.N.R.S., Professeur honoraire.
M. DURAND Emile Doyen honoraire
M. ESCANDE Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. GAUSSEN Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. JACQUES Professeur honoraire
M. MASDUPUY Professeur honoraire
M. MATHIS Doyen honoraire
M. MIGNONAC Professeur honoraire
M. MORQUER Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. SECONDAT Professeur honoraire
M. TESSIE-SOLIER Professeur honoraire
M. VANDEL Professeur honoraire, Membre de l'Institut

PROFESSEURS

M. CASTERAS Géologie, Correspondant de l'Institut
M. CAPDECOMME Minéralogie, Correspondant de l'Institut
M. NOUVEL Biologie générale
M. GALLAIS Chimie, Membre de l'Institut
M. DURAND Emile Physique
M. FERT Physique
M. LESBRE Chimie organique
M. BRUNEL Physiologie végétale
M. HURON Mathématiques appliquées
M. MARGULIS Pédologie
M. TRICHE Chimie Analytique et Spectrographie
M. LEDOUX Zoologie appliquée
M. RIVALS Agriculture
M. PERRIER Physique
M. MATHIS Chimie
M. ORLIAC Géochimie et Minéralogie
M. LAFOURCADE Physique
M. ANGELIER Ecologie
Mlle DE FERRE Botanique
M. FARRAN Minéralogie et Géotechnique
M. LAUDET Physique Théorique et Calcul Numérique
M. SERFATY Biologie Animale
M. LAGASSE Electrotechnique
M. BLANC Physique Nucléaire
M. LEREDDE Botanique
M. LELUBRE Géologie
M. TROCHAIN Botanique
M. LALAGUE Mathématiques générales
M. BOUIGUE Astronomie
M. COUCHET Physique
M. LASCOMBES Botanique
M. ASSELINEAU Chimie Biologique
M. MAURET Chimie systématique
M. AGID Physiologie
M. MONTANT Cryptogamie
M. GAUTIER Physique
M. CRUMEYROLLE Mathématiques
M. GOUFINARD Géologie
M. PULOU Minéralogie
M. CAMBOU Physique spatiale
M. MIQUEL Chimie
M. LACOSTE Electrotechnique
M. THIBAUT Mécanique Rationnelle et Appliquée
M. MASCART Mathématiques

M. MEDIONI Psychophysiologie
M. RAYNAUD Pierre Physiologie animale
M. ZALTA Chimie Biologique
M. SEVELY Electrotechnique
M. POMMIEZ Mathématiques
M. REY Paul Biologie végétale
M. COULOMB Physique
M. TRINQUIER Physique
M. MARONI Chimie
M. BEETSCHEN Biologie générale
M. DERACHE Physiologie animale
M. SATGE Chimie organique
M. LATTES Chimie
M. VEDRENNE Géophysique
M. DURAND-DELGA Géologie
M. CARRARA Physique
M. JEANNIN Chimie Minérale
M. MAHENC Chimie
M. MIROUZE Géologie
M. BITSCH Zoologie

PROFESSEURS ASSOCIES

M. ANDERSON Physique Spatiale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. PICCA Physique
M. MERIC Mathématiques appliquées
Mme LECAL Zoologie
M. PILOD Physique
M. LARROQUE Physique
M. BARRANS Chimie
Mlle LAPEYRE Mathématiques - Informatique
M. BERTRAND Chimie
M. DESQ Mathématiques
M. ROCARD Electronique
M. DEGEILH Physique
M. POILBLANC Chimie
M. TOUZE Physiologie végétale
M. FRASNAY Mathématiques
M. CASSAGNAU Zoologie
M. GUERIN Mathématiques
M. PESCIA Physique
M. SOUQUET Géologie
M. SCHNEIDER Biologie cellulaire
M. SICARD Biologie génétique
M. de LOTH Chimie physique
M. MARTIN J.C Génie Electrique
M. SAPORTE Physique
M. PERENNOU Informatique
M. THENOZ Génie civil
M. REY Gérard Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. CAUSSINUS Mathématiques Appliquées
M. DURAND Ph. Physique
M. CASTAN Informatique
M. REME Mesures Physiques

MAITRES DE CONFERENCES

M. FONTAN Physique nucléaire
M. BAUDRAS Chimie biologique
M. ATTEIA Mathématiques
M. CALVET Mécanique des fluides
M. PAGANI Physique
M. CUPPENS Mathématiques
Mlle BARBANCE Mathématiques
M. VERDIER Physique
M. GILLY Génie mécanique
M. BEAUFILS Informatique

M. COTTU	Génie mécanique
M. ROUTIE	Génie chimique
M. MARAL	Physique
M. BERTHELEMY	Zoologie
M. HURAU	Physique
M. LEGRAND	Génie civil
M. ABATUT	Electronique, Electrotechnique, automatique
M. SOTIROPOULOS	Chimie organique
Mme GERVAIS	Chimie inorganique
M. BONEL	Chimie
M. MAUSS	Mécanique
M. TERJANIAN	Mathématiques
M. BANCEL	Mathématiques
M. JOSSE RAND	Mesures Physiques
M. BETOURNE	Informatique
M. CAMPAN	Psychophysiologie
M. CLERC	Mécanique
M. GRIFONE	Mathématiques
M. ETINGER	Mathématiques
M. LETAC	Mathématiques
M. BONNET Louis	Biologie
M. LOUARN	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M. BACCAR	Chimie Organique
-----------------	------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. PRADINES	Mathématiques
M. NGUYEN THANH VAN	Mathématiques
M. GALINIER Michel	Informatique

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. NOUGARO	Hydraulique Générale et appliquée
M. GARDY	Génie chimique
M. BIREBENT	Electronique appliquée
M. VOIGT	Chimie minérale
M. MONTEL	Chimie physique et electrochimie
M. THIRRIOT	Hydrodynamique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. GRUAT	Mécanique des fluides (hydraulique)
M. BUGAREL	Génie chimique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. HAMANT	Botanique
Melle BERDUCOU	Physiologie végétale
M. DAT	Mécanique des fluides
M. FALLOT	Biologie végétale (Viticulture et arboriculture)
M. TRUCHASSON	Mécanique

M. HOFFMANN	Electronique
M. ENJALBERT	Chimie
M. MARTY	Physique industrielle
M. LEFEUVRE	Electronique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. ANGELINO	Génie chimique
M. DABOSI	E.N.S.C.T.

MAITRES DE CONFERENCES

M. MATHIEU	Chimie analytique
M. TRANNOY	Physique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. CASTAGNETTO	Mathématiques (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. GILOT	Génie chimique (Institut du Génie chimique)
M. CALMON	Techniques agricoles
M. MATHEAU	Electronique

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. NOAILLES	Informatique
-------------------	--------------

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. ROQUES	Chimie industrielle
M. GRATELOUP	Génie électrique
M. MASO	Génie civil
M. MIRA	Génie électrique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. COLLETTE	Physique
M. FAGET	Physique
M. DURAND Gilbert	Chimie
M. SCHUTTLER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M. LETURCO	Génie électrique
M. SIRIEYS	Génie Civil
M. BROUSSEAU	Physique

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. LACAZE	Mathématiques
-----------------	---------------

ADMINISTRATION

M. PRINEAU	Secrétaire Général de l'Université Paul Sabatier
------------------	--

L' ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE :
SON INCORPORATION DANS LES LIPIDES
TISSULAIRES DE RAT ET SON ACTION
SUR LE METABOLISME PHOSPHOLIPIQUE.

COMPOSITION DU JURY

Président : J. ASSELINEAU

Professeur de Chimie Biologique à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Directeur du Centre de Recherches de Biochimie et de Génétique Cellulaires (C.N.R.S.).

Examineurs: R. AGID

Professeur de Physiologie à l' Université Paul Sabatier de Toulouse.

L. DOUSTE-BLAZY

Professeur de Biochimie Médicale à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Directeur de l'Unité de Recherches sur la Biochimie des Lipides (I.N.S.E.R.M.).

P. MANDEL

Professeur de Biochimie Médicale à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

Directeur du Centre de Neurochimie du C.N.R.S.

E. NEUZIL

Professeur de Biochimie Médicale à l'Université de Bordeaux II.

J'adresse mes remerciements

aux membres du Jury :

Monsieur Douste-Blazy pour l'étude intéressante
qu'il m'a proposée au sein de son laboratoire, la
confiance qu'il m'a accordée dans sa réalisation, et
pour sa gentillesse à mon égard.

Monsieur Asselineau pour son accueil toujours
bienveillant et pour les conseils dont il m'a gratifiée.

Monsieur Neuzil pour l'intérêt qu'il a porté
à mes recherches

Messieurs Agid et Mandel qui me font l'honneur
d'examiner et de juger ce travail.

à Madame Asselineau
qui s'est toujours montrée disponible pour me
conseiller et m'aider et pour la sympathie qu'elle
m'a témoignée.

à ceux qui ont participé à ces
recherches :

Josette Marmouyet

Monique Plantavid

Masato Tamari

Hughes Chap

à mes camarades du
Laboratoire d'Analyses Médicales du Centre Anticancéreux
qui m'ont, en toutes circonstances, soutenu et encouragé.

à Madame Philippe
pour la dactylographie du manuscrit.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'R. B.' with a long horizontal stroke underneath.

PRINCIPALES ABBREVIATIONS

1-AEP	acide 1-aminoéthylphosphonique
2-AEP (ou AEP)	acide 2-aminoéthylphosphonique
AP	acide phosphatidique
ATP	adénosine triphosphate
CDPE	cytidine diphosphate éthanoalamine
CMP	cytidine monophosphate
CMP-AEP	cytidine monophosphate aminoéthylphosphonate
CoA	coenzyme A
CTP	cytidine triphosphate
diméthyl POPOP	1,4-bis-(2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl))-benzène
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
P _i	phosphate inorganique
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PPO	2,5-diphényloxazole
PS	phosphatidylsérine
TCA	acide trichloracétique.

REACTIFS UTILISES

1-AEP	Calbiochem, Los Angeles (U.S.A)
2-AEP	Calbiochem, Los Angeles (U.S.A)
Acide ascorbique	Merck, Darmstadt (Allemagne)
ATP	Fluka, Buchs (Suisse)
CDPE	Sigma, Saint Louis (U.S.A)
CMP	Fluka, Buchs (Suisse)
Coenzyme A	Boehringer et Soehne, Mannheim (Allemagne)
CTP	Calbiochem, Los Angeles (U.S.A)
N,N'-dicyclohexylcarbodiimide	Fluka, Buchs (Suisse)
Diméthyl POPOP	Packard Instruments Cie, Downers Grove (U.S.A)
1,2 dipalmitate de glycérol	Fluka, Buchs (Suisse)
EDTA	Merck, Darmstadt (Allemagne)
Ethan-1-ol-2-amine-2- ¹⁴ C (chlorhydrate)	The Radiochemical Centre, Amersham (Angleterre)
Extrait de levure	Difco, Détroit (U.S.A)
Glutathion (réduit)	Merck, Darmstadt (Allemagne)
α-glycérophosphate de sodium	Fluka, Buchs (Suisse)
Phosphate de Sodium ³² P (Solution injectable)	Commissariat à l'Energie Atomique, Gif sur Yvette (France)
Phosphorylcholine	Calbiochem, Los Angeles (U.S.A)
Phosphoryléthanolamine	Calbiochem, Los Angeles (U.S.A)
Phosphorylsérine	Calbiochem, Los Angeles (U.S.A)
PPO	Packard Instruments Cie, Downers Grove (U.S.A)
Protéose-peptone n°4	Difco, Détroit (U.S.A)
Résines Dowex 1-X ₂ , Dowex 50-X ₄	Bio-Rad, Richmond (U.S.A)
L-sérine	Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland (U.S.A)
L-sérine ¹⁴ C (U)	Commissariat à l'Energie Atomique, Gif sur Yvette
Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane	Merck, Darmstadt (Allemagne)

Les autres produits utilisés sont des produits purs R.P. : Prolabo, Paris (France).

AVERTISSEMENT

Afin d'éviter toute confusion, nous tenons à préciser que la présentation de cet ouvrage ne correspond pas à l'ordre chronologique dans lequel les recherches ont été effectivement réalisées.

PLAN

PREMIERE PARTIE : LA LIAISON CARBONE-PHOSPHORE	1
CHAPITRE 1 : Distribution des phosphonates dans les matériaux biologiques	3
CHAPITRE 2 : Biosynthèse <i>de novo</i> de la liaison carbone-phosphore	11
* CHAPITRE 3 : Biosynthèse <i>de novo</i> de phosphonates dans le foie de rat ...	17
SECONDE PARTIE : METABOLISME DE L'ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE DANS LES TISSUS DE MAMMIFERES	25
CHAPITRE 1 : Généralités sur le métabolisme des phosphonates	27
* CHAPITRE 2 : Métabolisme de l'acide 2-aminoéthylphosphonique chez le rat	31
I Incorporation de l'acide 2-aminoéthylphosphonique dans les lipides tissulaires de rat	31
II Incorporation de 2-AEP (³² P) dans la fraction hydrosoluble de cer- tains organes de rat	43
III Mise en évidence d'un dérivé nucléotidique comme intermédiaire de la biosynthèse des phosphonolipides dans le foie de rat	45
1 - CMP-AEP : intermédiaire de la biosynthèse des phosphonolipides dans le foie de rat	45
2 - L'acide 2-aminoéthylphosphonique, substrat pour la phosphoryl- éthanolamine-cytidyllyltransférase de foie de rat	51
3 - Incorporation de CMP-AEP (³² P) dans les lipides d'un homogénat de foie de rat	54
TROISIEME PARTIE : ACTION DE L'ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE SUR LE META- BOLISME DES PHOSPHOLIPIDES	57
CHAPITRE 1 : Généralités sur les phospholipides	59
* CHAPITRE 2 : Action de l'acide 2-aminoéthylphosphonique sur l'incorpora- tion de phosphate (³² P) dans les lipides	69
I Incorporation <i>in vitro</i> de HNa ₂ ³² PO ₄ dans les lipides de coupes de cerveaux de souris, en présence d'AEP	69
1 - Etude en fonction de la concentration en AEP	69
2 - Influence du temps d'incubation sur l'action de l'AEP	75
3 - Comparaison entre les actions de la phosphoryléthanolamine et de l'AEP	76
II Action de l'AEP sur l'incorporation <i>in vivo</i> du phosphate radioactif dans les lipides	78
1 - Incorporation <i>in vivo</i> de phosphate (³² P) dans les lipides de cerveaux et de foies de rats	78
2 - Action de l'AEP sur l'incorporation <i>in vivo</i> de phosphate (³² P) dans les lipides de cerveaux de jeunes souris	79

CHAPITRE 3 : Action de l'acide 2-aminoéthylphosphonique sur le métabolisme de la phosphatidylsérine et de la phosphatidyléthanolamine.	83
I Données récentes sur le métabolisme de la phosphatidylsérine	83
* II Action de l'AEP sur l'incorporation <i>in vitro</i> de L-sérine (^{14}C) dans les lipides	87
* III Inhibition de la décarboxylation <i>in vitro</i> de la phosphatidylsérine par l'acide 2-aminoéthylphosphonique	98
* IV Action de l'AEP sur l'échange de bases entre la phosphatidyléthanolamine et la L-sérine	104
* V Action de l'AEP sur le métabolisme de la phosphatidyléthanolamine .	108
1 - Incorporation d'éthanolamine (^{14}C) dans les lipides	108
2 - Inhibition de la phosphoryléthanolamine-cytidyltransférase de foie de rat par les acides 1 et 2 aminoéthylphosphoniques	109
<u>ADDENDA</u> : PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DE CERTAINS PHOSPHONATES	117
I Revue Bibliographique	117
* II L'acide 2-aminoéthylphosphonique et l'agrégation plaquettaire	120
<u>CONCLUSION</u>	129

PREMIERE PARTIE

LA LIAISON CARBONE - PHOSPHORE .

CHAPITRE 1

DISTRIBUTION DES PHOSPHONATES DANS LES

MATERIAUX BIOLOGIQUES

L'acide 2-aminoéthylphosphonique (AEP) est le premier -et le plus largement répandu- des phosphonates identifiés dans des matériaux biologiques. Il a été mis en évidence en 1959 par Horiguchi et Kandatsu dans un extrait éthanolique de *Tetrahymena pyriformis* (7).

Depuis, de nombreux microorganismes, invertébrés marins, tissus animaux et végétaux ont été analysés pour leur teneur en phosphonates.

Les résultats positifs des analyses effectuées à ce jour, sont résumés dans les tableaux 1 et 2.

TABLEAU 1 : Distribution de l'acide 2-aminoéthylphosphonique dans des matériaux biologiques.

ORGANISME			FORME BIOLOGIQUE DE L' A.E.P.	REFERENCES
Embranchement	Classe (ou espèce)	Nom (ou organe)		
Bactéries	Mycobactéries	<i>M.phlei, M.tuberculosis</i>	Phosphonolipide	1, 2 3
Protistes	Phytoplancton	Dinoflagellés (<i>Amphidinium carteri, Exuviella cassibica, Peridinium trochoïdum</i>) Coccolithophorides (<i>coccolithus huxleyi, Syracosphaera elongata</i>) <i>Monochrysis lutheri</i>		4 5
	Algue unicellulaire	Amibe : <i>Acanthamoeba castellanii, Tetrahymena pyriformis</i>	Phosphonoglycane	6 7 8 9 9, 10 11, 12
	Protozoaire		Diglycérade AEP Plasmalogène AEP Céramide AEP Monoéther-glycérade AEP 1-Alkoxy-2-acylglycérade ester AEP et le composé correspondant déacétylé Cytidine monophosphate AEP Associé aux protéines	13 8 14
Mollusques		<i>C.Japonica, Unio bivaie, Inversidens hirasei, Anodonta lauta rostrata, Cristaria plicata</i> <i>Lymnea stagnalis</i> <i>Lehmania poineri, Limus flavus</i> <i>Aplysia</i>		15 16 17 18 19, 20 49
	Limace			
	Escargot		Céramide AEP	

Suite du TABLEAU 1

ORGANISME			FORME BIOLOGIQUE DE L' A.E.P.	REFERENCES
Embranchement	Classe (ou espèce)	Nom (ou organe)		
	Moule	<i>Mytilus edulis</i>	Céramide AEP	21
	Palourde	<i>Hyriopsis schlegelii</i>		22
		<i>Venus mercenaria</i>		21
		<i>Corbicula sandai</i>		16
	Buccin	<i>Busycon canaliculatum</i>	Céramide AEP	19, 23
	Huitre	<i>Ostrea gigas</i>		21
	Abalone	<i>Crassostrea gigas</i>	Phosphonolipide	24
		<i>Habiotis midae</i>	Phosphonolipide (céramide AEP)	25
				26
Coelentérés	Anémone de mer	<i>Anthopleura elegantissima</i>	Céramide AEP	27
			Céramide AEP = 1 (0.phosphonoéthyl-amine)-N-acylsphingosine	28, 29
			Protéines, glycoprotéines*	30
		<i>Metridium dianthus</i>		31
		<i>Tealia felina</i>		17, 21, 32, 50
		<i>Anthopleura xanthogrammica</i>		21, 32
Echinodermes		<i>Metridium senile</i>	Phosphonoglycoprotéines	33
			Céramide AEP	34
			Protéines : protéases A et B pures	35, 51
			Phosphonoglycoprotéines	36
				34
				21

.../...

Suite du TABLEAU 1

ORGANISME		FORME BIOLOGIQUE DE L' A.E.P.	REFERENCES
Embranchement	Classe (ou espèce)		
Vertébrés (mammifères)	Chèvre		
	Boeuf		37
	Homme		38 39
		Phosphonolipides - protéines	40 41 41 41

**Pelagia Colorata*, *Tubipora musica*, *Muriciopsis flavida*, *Euginea succinea*, *Briarium asbestinum*, *Microputularia sp.*, *Renilla kollikeri*, *Zoanthus sociatus*, *Harenactis*, *Tealia felina*, *A. elegantissima*, *A. xanthogrammica*, *A. kurogane*, *A. pacifica*, *Metridium senile*, *Acropora pulchra*, *Stylophora pistillata*, *Fungia fungites*, *Favia speciosa*.

TABLEAU 2 : Dérivés de l'acide 2-aminoéthylphosphonique isolés à l'état naturel.

Dérivé	Formule	Organisme ou organe	Forme biologique	Références
2-monométhyl AEP	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}$	<i>Tetrahymena pyriformis</i> Gastropode Coquille St-Jacques <i>Turbo cornutus</i> Anémone de mer: <i>A.xanthogrammica</i>	Céramide monométhyl AEP N-palmitoylsphingosyl (C ₁₆) -2N-méthyl AEP Sphingophosphonolipide Céramide 2N méthyl AEP Phosphonolipides Protéines Glycoprotéines	42 43 44 45 46 33 34
2-diméthyl AEP	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Anémone de mer: <i>A.xanthogrammica</i>	Phosphonolipide	46
2-triméthyl AEP	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Anémone de mer: <i>A.xanthogrammica</i> Aorte humaine athéromateuse	Phosphonolipide	46 47
Acide 2-amino-3-phosphonopropionique	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	<i>Tetrahymena pyriformis</i> Anémone de mer: <i>Zoanthus sociatus</i>		48 48
1-hydroxy 2-AEP	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Amibe : <i>Acanthamoeba castellanii</i>	Phosphonoglycane	6

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - M. HORIGUCHI
J. Chem. Soc. Japan (1966) 40, R 25.
- 2 - M. HORIGUCHI
Tanpakushitsu-Kakusan-Kovo (1967) 12, 315.
- 3 - G. RAGHUPATI SARMA, V. CHANDRAMOULI et T.A. VENKITASUBRAMANIAN
Biochim. Biophys. Acta (1970) 218, 561.
- 4 - J.S. KITTREDGE, M. HORIGUCHI et P.M. WILLIAMS
Comp. Biochem. Physiol. (1969) 29, 859.
- 5 - M.W. BALDWIN et J. BRAVEN
J. Mar. Biol. Ass. U.K. (1968) 48, 603
- 6 - E.D. KORN, D.G. DEABORN, H.M. FALES et E.D. SOKOLOSKI
J. Biol. Chem. (1973) 248, 2257.
- 7 - M. HORIGUCHI et M. KANDATSU
Nature (1959) 184, 901.
- 8 - C.R. LIANG et H. ROSENBERG
Biochim. Biophys. Acta, (1966) 125, 548.
- 9 - R.M.C. DAWSON et P. KEMP
Biochem. J. (1967) 105, 837.
- 10- H.E. CARTER et R.C. GAVER
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1967) 29, 886.
- 11- G.A. THOMPSON Jr.
Biochemistry (1967) 6, 2015.
- 12- G.K. CHACKO et D.J. HANAHAN
Biochim. Biophys. Acta (1968) 176, 190.
- 13- J.D. SMITH, W.R. SNYDER et J.H. LAW
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1970) 39, 1163.
- 14- H. ROSENBERG
Nature (1964) 203, 299
- 15- A.J. DE KONING
J. Sci. Food Agric. (1966) 17, 460.
- 16- T. HORI, O. ITASAKA, H. INOUE et K. YAMADA
J. Biochem (Tokyo) (1964) 56, 477.
- 17- L.D. QUIN
Science (1964) 144, 1133.
- 18- C.R. LIANG et H. ROSENBERG
Comp. Biochem. Physiol. (1968) 25, 673.
- 19- T. HORI, I. ARAKAWA et M. SUGITA
J. Biochem. (Tokyo)(1967) 62, 67.

- 20- C.R. LIANG et K.P. STRICKLAND
Can. J. Biochem. (1969) 47, 85.
- 21- L.D. QUIN
Biochemistry (1965) 4, 324.
- 22- O. ITASAKA, T. HORI et M. SUGITA
Biochim. Biophys. Acta (1969) 176, 783.
- 23- T. HORI, O. ITASAKA, T. HOSHIMOTO, et H. INOUE
J. Biochem (Tokyo) (1964) 55, 545.
- 24- A. HAYASHI, T. MATSUBARA et Y. MISHIMA
J. Fac. Sci. Technol. Kinki Univ. (1967) 2, 39.
- 25- M. TAMARI et M. KAMETAKA
Agr. Biol. Chem. (1972) 36, 1147.
- 26- A.J. DE KONING
Nature (1966) 210, 113.
- 27- J.S. KITTREDGE
Thesis University of California, San Diego (1965)
- 28- J.S. KITTREDGE, E. ROBERTS et D.G. SIMONSEN
Biochemistry (1962) 1, 624.
- 29- J.S. KITTREDGE, D.G. SIMONSEN, E. ROBERTS et B. JELINCK
dans J.T. Holden (Editeur) *Aminoacid pools*, Elsevier Publishing Company,
Amsterdam (1962) p. 176.
- 30- G. ROUSER, G. KRITCHEVSKY, D. HELLER et E. LIEBER
J. Amer. Oil. Chemist's. Soc. (1963) 40, 425.
- 31- G. SIMON et G. ROUSER
Lipids (1967) 2, 55.
- 32- L.D. QUIN
dans M. Grayson et E.J. Griffith (Editeurs) : *Topics in phosphorus chemistry*
vol. 4 Interscience Publishers New-York (1967) p.23.
- 33- F.A. SHELBURNE et L.D. QUIN
Biochim. Biophys. Acta (1967) 148, 595.
- 34- D.S. KIRKPATRICK et S.H. BISHOP
Biochemistry (1973) 12, 2829.
- 35- W.T. MASON
Biochim. Biophys. Acta (1972) 280, 538.
- 36- K.J. STEVENSON, D. GIBSON, G.H. DIXON
cités par J.S. Kittredge et E. Roberts
Science (1969) 164, 37.
- 37- M. KANDATSU et M. Horiguchi
Agr. Biol. Chem. (1965) 29, 781.
- 38- H. SHIMIZU, Y. KAKIMOTO, T. NAKAJIMA, A. KANAZAWA et I. SANO
Nature (1965) 207, 1197.

- 39- M. TAMARI et M. KAMETAKA
Agr. Biol. Chem. (1973) 37, 993.
- 40- J.A. ALHADEFF et G.D. DAVES Jr.
Biochemistry (1970) 9, 4866.
- 41- J.A. ALHADEFF et G.D. DAVES Jr.
Biochim. Biophys. Acta (1971) 244, 211.
- 42- C.V. VISWANATHAN et H. ROSENBERG
J. Lipid Research (1973) 14, 327.
- 43- A. HAYASHI, Y. MATSUBARA et F. MATSUURA
Yukagaku (1969) 18, 118.
- 44- T. HORI, M. SUGITA et O. ITASAKA
J. Biochem. (Tokyo) (1969) 65, 451.
- 45- A. HAYASHI, F. MATSUURA et Y. MATSUBARA
Biochim. Biophys. Acta (1969) 176, 208.
- 46- J.S. KITTREDGE, A.F. ISBELL et R.R. HUGHES
Biochemistry (1967) 6, 289.
- 47- A.U. ALAM et S.H. BISHOP
Abstr. Div. Biol. Chem. 156ème meeting de l'Am. Chem. Soc. Atlantic City
9-13 Septembre (1968).
- 48- J.S. KITTREDGE et R.R. HUGHES
Biochemistry (1964) 3, 991.
- 49- Y. KOMAI, S. MATSUKAWA et M. SATAKE
Biochim. Biophys. Acta, (1973) 316, 271.
- 50- R.L. HILDERBRAND, T.O. HENDERSON, T. GLONEK et T.C. MYERS
Biochemistry, (1973) 12, 4756.
- 51- K.A. KARLSSON et B.E. SAMUELSSON
Biochim. Biophys. Acta, (1974) 337, 204.

CHAPITRE 2

BIOSYNTHESE "DE NOVO" DE LA LIAISON

CARBONE – PHOSPHORE

La biosynthèse *de novo* de la liaison C-P a été démontrée dans *Tetrahymena pyriformis* par Kandatsu et Horiguchi (1), et dans le phytoplancton (2). De même, une rapide conversion de ^{32}P -phosphate en AEP a été mise en évidence dans les anémones de mer *Anthopleura xanthogrammica* et *A. elegantissima* ainsi que dans l'hydre *Clorohydra viridissima* (3). L'escargot *Helise aspersa*, les limaces *Lehmannia poineri* et *Limus flavus* (4), la moule *Hyriopsis schlegelli* (5) biosynthétisent également la liaison C-P.

Le mécanisme de formation de la liaison phosphonate a fait l'objet de nombreuses recherches, avec, comme matériau exclusif : *Tetrahymena pyriformis*.

C'est en 1965 que Segal (6) s'appuyant sur les travaux de Rouser (7) et Rosenberg (8) émet la première hypothèse concernant la biosynthèse de l'AEP. Rosenberg, après incorporation de ^{32}P -phosphate dans *Tetrahymena*, trouvait un taux de radioactivité plus important dans les phosphonolipides que dans l'AEP libre. Segal en conclut que le phosphonolipide est un précurseur de l'AEP libre et de l'AEP lié aux protéines.

Son hypothèse est que le phosphonolipide (glycéride-AEP) dérive du phospholipide analogue, la phosphatidyléthanolamine, par l'intermédiaire d'un acide phosphoramidique.

La théorie de Segal est mise en échec en 1967 par Thompson (9). Ce dernier, utilisant (^{14}C)-éthanolamine comme précurseur dans une culture de *Tetrahymena* obtient 69% de la radioactivité dans les céphalines et 24% dans les lécithines. Une hydrolyse acide de la première fraction ne libère pas d'AEP radioactif mais seulement (^{14}C)-éthanolamine. L'AEP ne dérive donc pas de la phosphatidyléthanolamine. Peu après, Warren (10) démontre que l'acide phosphoénolpyruvique est un précurseur de l'AEP *in vitro* dans les extraits cellulaires de *Tetrahymena* et propose le mécanisme suivant (fig. 1).

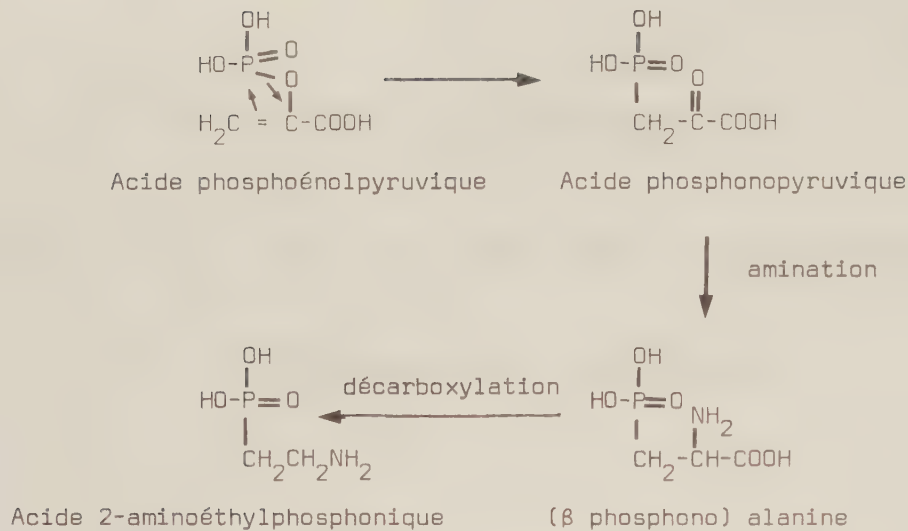


FIGURE 1 : Mécanisme proposé par Warren (1968) pour la biosynthèse de l'AEP à partir de l'acide phosphoénolpyruvique.

Parallèlement, Liang et Rosenberg (11) d'une part, Trebst et Geike (12) d'autre part parviennent à la même conclusion que Warren : le précurseur de l'AEP est un intermédiaire glycolytique, l'acide phosphoénolpyruvique. Horiguchi *et coll.* (13) suggèrent de plus que le C₁ de l'AEP dérive du C₃ du phosphoénolpyruvate (ou de l'énoloxaloacétate) le C₂ de l'AEP dérivant du C₂ du phosphoénolpyruvate (ou de l'oxaloacétate), (la numérotation s'effectue à partir de l'atome de phosphore).

Mais Liang et Rosenberg, se fondant sur les résultats de leurs travaux antérieurs (8), pensent que la liaison C-P est synthétisée d'abord dans les lipides et que l'acide phosphoénolpyruvique réagit avec un ester de l'acide phosphatidique (fig. 2).

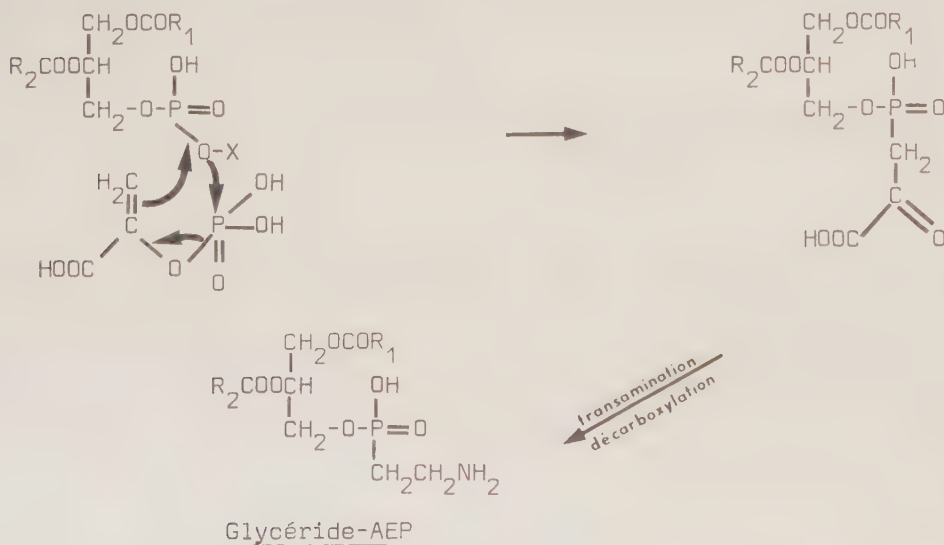


FIGURE 2 : Mécanisme proposé par Liang et Rosenberg (1968) pour la biosynthèse de la liaison C-P.

Par la suite, Thompson (14) montre que des acides gras tritiés sont rapidement incorporés dans les phosphatidylcholines de *Tetrahymena pyriformis*. La radioactivité des phosphatidylcholines diminue ensuite pendant que celle des diglycéride-AEP augmente, indiquant par là un transfert progressif du diglycéride marqué sur les phosphonolipides.

Il en conclue que l'acide phosphatidique du schéma de Liang et Rosenberg (Fig. 2) est estérifié par la choline (X = choline).

Cependant, le mécanisme proposé par Warren (Fig. 1) est actualisé en 1970 par les travaux de Smith et Law (15). Ces auteurs, étudiant l'incorporation *in vivo* de $2(^{14}\text{C})$ (β -phosphono)alanine et de (^{14}C) AEP dans *Tetrahymena*, trouvent que l'AEP est incorporé dans les lipides au taux de 10 % et n'observent aucune dégradation. Par contre, une partie du (β -phosphono)alanine incorporé par les cellules est retrouvé dans les phospholipides sous forme d'AEP, mais les auteurs ne détectent pas de (β -phosphono)alanine dans les lipides.

D'autre part, une partie de la radioactivité du (β -phosphono)alanine se retrouve dans les acides gras, ce qui implique sa dégradation. Le (β -phosphono)alanine serait donc un précurseur de l'AEP conformément au schéma de Warren (Fig. 1).

Des travaux plus récents de Horiguchi (16) confirment les résultats de Smith et Law. Cependant, il propose (Fig. 3) comme autre précurseur de l'AEP - outre le (β -phosphono)alanine - le phosphono-acétaldéhyde. Or, il se trouve que ce dernier composé est un intermédiaire de la dégradation de l'AEP par *Bacillus Cereus* (17).

D'après Horiguchi (16) la voie de biosynthèse de l'AEP passant par le phosphonoacétaldéhyde serait prédominante.

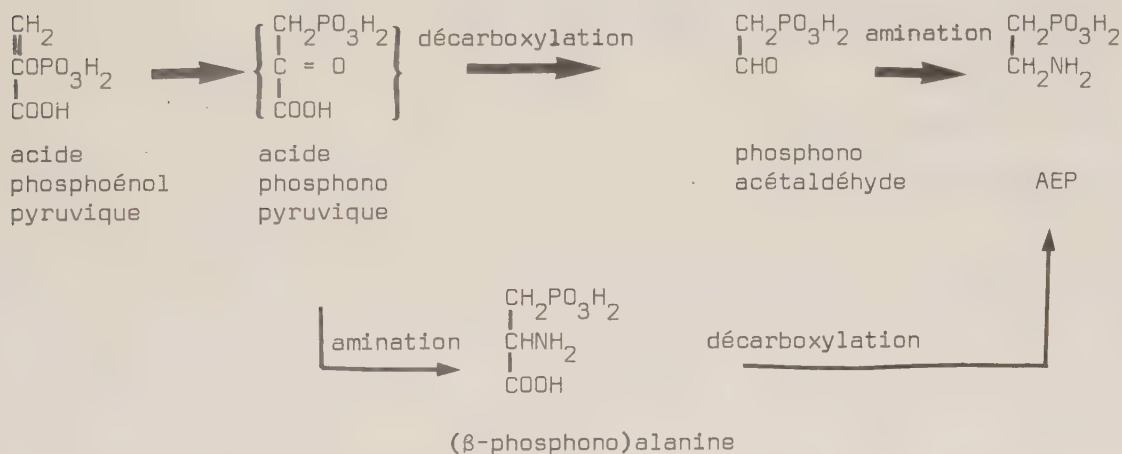


FIGURE 3 : Mécanisme proposé par Horiguchi (1970) pour la biosynthèse de l'AEP

Le schéma de Horiguchi (Fig. 3) représente le dernier mécanisme de biosynthèse de l'AEP proposé à ce jour. On remarque que l'AEP est le précurseur des phosphonolipides et non pas l'inverse comme dans le schéma de Liang et Rosenberg (Fig. 2). Toutefois, l'acide phosphopyruvique n'a pas été isolé des extraits de *Tetrahymena*. Kittredge (18) n'a pu démontrer la formation du dinitrophénylhydrazone de l'acide phosphopyruvique.

D'autre part, le phosphonoacétaldéhyde n'a pas été isolé non plus.

Il en ressort que l'unique certitude est que l'acide phosphoénolpyruvique est un précurseur de l'AEP.

Le débat reste donc ouvert quant au mécanisme qui conduit du phosphoénolpyruvate à l'acide 2-aminoéthylphosphonique et plusieurs équipes de recherche -dont celles de Horiguchi au Japon, et de Rosenberg en Australie- essaient d'élucider ce problème.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - M. KANDATSU et M. HORIGUCHI
Agr. Biol. Chem. Tokyo, (1962) 26, 721.
- 2 - J.S. KITTREDGE, M. HORIGUCHI et P.M. WILLIAMS
Comp. Biochem. Physiol. (1969) 29, 859.
- 3 - J.S. KITTREDGE et E. ROBERTS
Science (1969) 164, 37.
- 4 - C.R. LIANG et H. ROSENBERG
Comp. Biochem. Physiol. (1968) 25, 673.
- 5 - O. ITASAKA, T. HORI, M. SUGITA
Biochim. Biophys. Acta (1969) 176, 783.
- 6 - W. SEGAL
Nature (1965) 208, 1284.
- 7 - G. ROUSER, G. KRITCHEVSKY, D. HELLER et E. LIEBER
J. Amer. Oil Chemist's Soc. (1963) 40, 425.
- 8 - H. ROSENBERG
Nature (1964) 203, 209.
- 9 - G.A. THOMPSON Jr.
Biochemistry (1967) 6, 2015.
- 10- W.A. WARREN
Biochim. Biophys. Acta (1968) 156, 340.
- 11- C.R. LIANG et H. ROSENBERG
Biochim. Biophys. Acta (1968) 156, 437.
- 12- A. TREBST et F. GEIKE
Z. Naturforsch (1967) 22 b, 989.
- 13- M. HORIGUCHI, J.S. KITTREDGE et E. ROBERTS
Biochim. Biophys. Acta (1968) 165, 164.
- 14- G.A. THOMPSON Jr.
Biochim. Biophys. Acta (1969) 176, 330.
- 15- J.D. SMITH et J.H. LAW
Biochemistry (1970) 9, 2152.
- 16- M. HORIGUCHI
Biochim. Biophys. Acta (1972) 261, 102.

- 17- J.M. LA NAUZE et H. ROSENBERG
Biochim. Biophys. Acta (1968) 165, 438.
- 18- J.S. KITTREDGE
Ph. D. dissertation, University of California, San Diego, Calif. (1965).

CHAPITRE 3

BIOSYNTHESE "DE NOVO" DE PHOSPHONATES

DANS LE FOIE DE RAT

En collaboration avec Josette MARMOUYET

La présence de phosphonates a été mise en évidence dans certains tissus de mammifères et en particulier dans le foie de chèvre (1), le cerveau de boeuf (2) et des tissus humains (3 - 5). Mais dans aucun cas une biosynthèse *de novo* de la liaison C-P n'avait été démontrée chez des vertébrés.

MATERIEL ET METHODES

- Animaux

Onze rats albinos souche Wistar, pesant entre 80 et 120g, reçoivent chacun une injection intrapéritonéale de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ (3mCi) en solution isotonique. Les animaux ont libre accès à la nourriture et à la boisson et sont sacrifiés par décapitation 24 heures après l'injection

- Hydrolyse

Les foies sont prélevés, découpés en fines lamelles et hydrolysés pendant 48 heures par HCl 6N au reflux. L'hydrolysat est filtré sur laine de verre et évaporé plusieurs fois pour éliminer HCl (on ajoute environ 100 ml d'eau distillée entre chaque évaporation). Le résidu est dilué dans 10 ml de CH_3COOH 0,5N.

- Résines échangeuses d'ions

Nous utilisons des résines Dowex 1-X₂ (200-400 mesh) et Dowex 50-X₄ (100-200 mesh).

Les résines échangeuses d'anions sont utilisées sous forme acétate ; elles sont conditionnées par 5 volumes* d'une solution de CH_3COONa 3N, 5 volumes d'eau et enfin 5 volumes de CH_3COOH 0,5N qui est l'éluant. Le phosphate est retenu

* volume de la colonne de résine

sur Dowex-1 (forme acétate) et les composés aminophosphoniques sont élués au front de l'acide acétique (6).

Les résines échangeuses de cations sont conditionnées par 3 volumes de NaOH 3 N, un lavage par l'eau distillée jusqu'à neutralité, 3 volumes de HCl 3N et un lavage par l'eau distillée jusqu'à neutralité ; la résine est ensuite mise dans HCOOH 1N. Les composés à chromatographier sont dissous dans HCOOH 1N. Le phosphate est élué par lavage de la colonne de résine Dowex-50 par de l'eau distillée. Les composés aminés neutres (dont les aminophosphonates) qui sont restés fixés sur la colonne, sont élués par NH_4OH 3N (6).

Dans certains cas, des fractions sont collectées par un fractionneur automatique à numération électronique (Paris-Labo)

- Chromatographies sur couche mince

Après chaque passage sur colonne, une partie aliquote de l'éluat est chromatographiée sur couche mince de silica-gel G (témoins 2-AEP et $^{32}\text{P}_i$). Les solvants utilisés sont -I : acide acétique 0,02M dans de l'éthanol à 60% ; -II : phénol-eau (4:1 v/v) ; -III : isopropanol-acide formique-eau (8:1:1 v/v/v).

Les composés radioactifs sont détectés par autoradiographie (films Kodirex). Les groupements aminés sont visualisés par vaporisation d'une solution de ninhydrine.

- Radioactivité

La radioactivité est déterminée par scintillation en milieu liquide (Packard-Tricarb modèle 3 390).

RESULTATS

Une première chromatographie de l'hydrolysate de foies de rats sur Dowex-1 (20 x 2 cm) élimine une grande partie des pigments qui restent fixés sur la colonne (**). L'éluat est évaporé à sec, repris par 10 ml de HCOOH 1N et passé sur colonne Dowex 50- X_4 (50 x 3 cm). Les ions "phosphates" sont éliminés par lavage de la colonne par 500 ml d'eau distillée. Les composés aminés sont élués par 500 ml de NH_4OH 3N. Après plusieurs évaporations pour éliminer NH_4OH , l'éluat repris par 10 ml de HCOOH 1N est rechromatographié deux fois sur colonne Dowex-50 (30 x 2 cm). Lors de la dernière élution par NH_4OH 3N on recueille des fractions de 5 ml dont la radioactivité est déterminée sur des parties aliquotes de 0,01 ml. Un pic de radioactivité est situé dans les tubes n°27 à 32 (Fig.1), c'est à dire au front de l'ammoniaque.

Le pic radioactif est concentré et chromatographié sur Dowex-1 (20x1 cm) pour éliminer les dernières traces de phosphate. L'éluat (100 ml de CH_3COOH 0,5 N) est concentré et rechromatographié sur Dowex-1 (20 x 1 cm). Des fractions de 3 ml sont collectées et leur radioactivité déterminée sur 0,01 ml. On note la résolution (incomplète) du premier pic obtenu sur Dowex-50 en deux pics radioactifs entre les tubes n°3 et 10 (Fig.2).

Les fractions correspondantes sont concentrées, évaporées plusieurs fois pour éliminer CH_3COOH et des parties aliquotes sont chromatographiées sur couche mince de silica-gel G, dans les solvants I et II.

(**) Nous n'avons pas décoloré l'hydrolysate par du charbon végétal Norit qui est susceptible de retenir l'AEP (7).

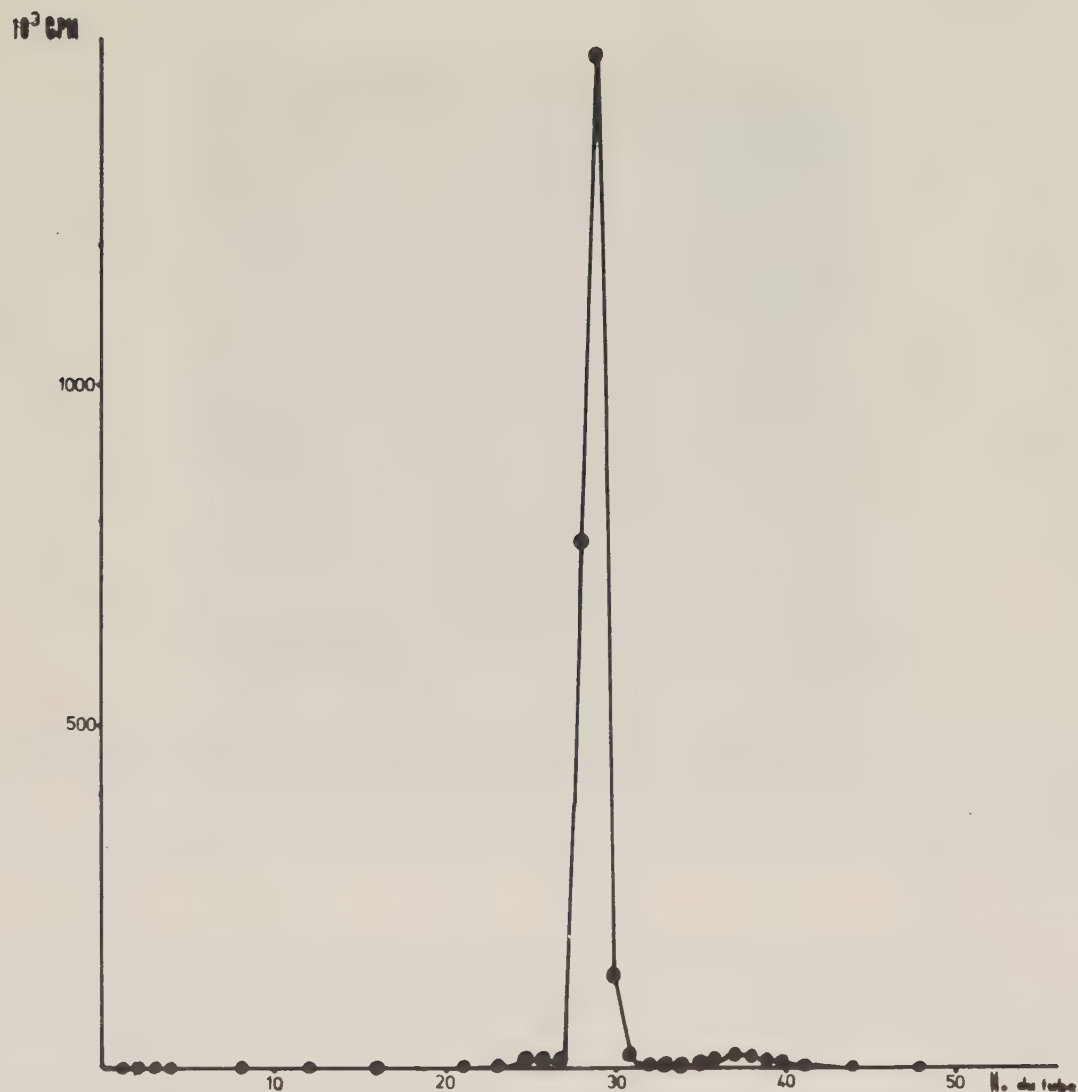


Figure 1 : Isolement, à partir d'un hydrolysats de foies de rats, de composés aminés neutres possédant une liaison non hydrolysable avec ^{32}P .

La colonne (Dowex-50 H^+) faite dans HCOOH 1N et lavée par de l'eau est éluée par NH_4OH 3N (fractions de 5ml).

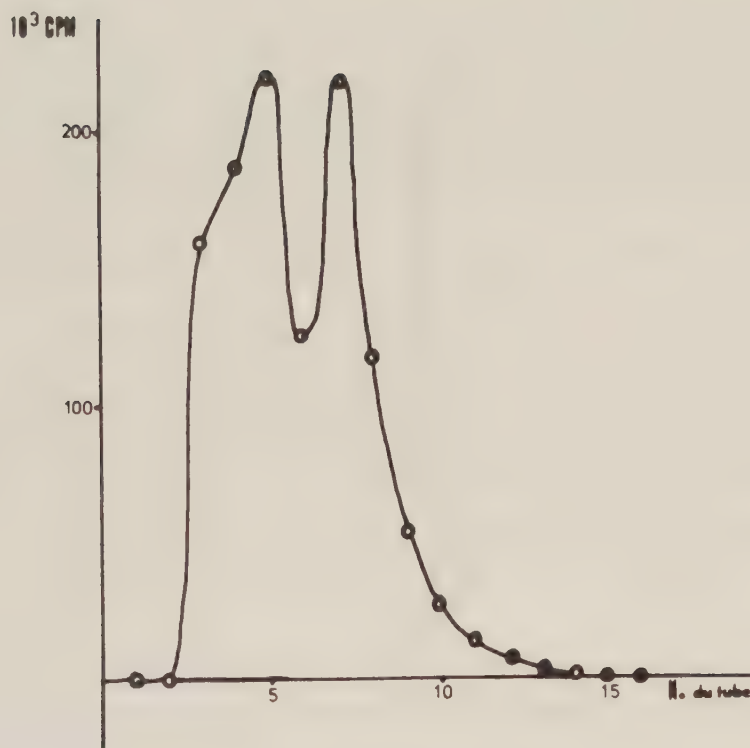


Figure 2 : Profil d'élution des composés aminés neutres possédant une liaison non hydrolysable avec ^{32}P .

Chromatographie sur Dowex-1 acétate. Elution par CH_3COOH 0,5N. On recueille des fractions de 3 ml.

Ces chromatographies (Fig. 3 et 4) mettent en évidence trois composés radioactifs qui ont résisté à l'hydrolyse acide. Cette résistance à l'hydrolyse est caractéristique de la présence d'une liaison covalente entre le phosphore et le carbone (8, 9) : il s'agit donc de phosphonates.

Le composé 1 contient 72% de la radioactivité, le composé 2 : 19% et le composé 3 : 9%.

Dans les deux solvants, le composé 2 migre au niveau du 2-AEP synthétique.

Les trois phosphonates sont séparés par chromatographie sur couche épaisse (2mm) de silica-gel G. Chaque bande révélée par autoradiographie est grattée et le composé radioactif est élué du gel de silice par de l'eau distillée.

Chaque éluat est dessalé sur Dowex-50 (20 x 1 cm) puis sur deux colonnes Dowex-1 (10 x 1 cm). Après évaporation à sec on traite le produit final par 0,2 ml d'alcool absolu qui dissout quelques pigments résiduels. Le produit cristallise (sous forme amorphe) dans 0,2 ml d'eau, 0,2 ml d'éthanol et 0,1 ml d'acétone.

Pour les trois composés nous avons obtenu une quantité infime de matériel (il a fallu à Shimizu *et coll.* (2) près de 30 kg de cerveaux de boeuf pour obtenir 18 mg d'acide 2-aminoéthylphosphonique, et nous n'avons traité que 60g de foies de rats).



Figure 3 : Autoradiogramme de la chromatographie sur couche mince d'un hydrolysat de foies de rats après injection intrapéritonéale de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$.

$^{32}\text{P}_i$ a été éliminé par chromatographies sur Dowex-50 et Dowex-1.

Solvant : acide acétique 0,02 M dans éthanol à 60%.

2-AEP révélé par la ninhydrine.

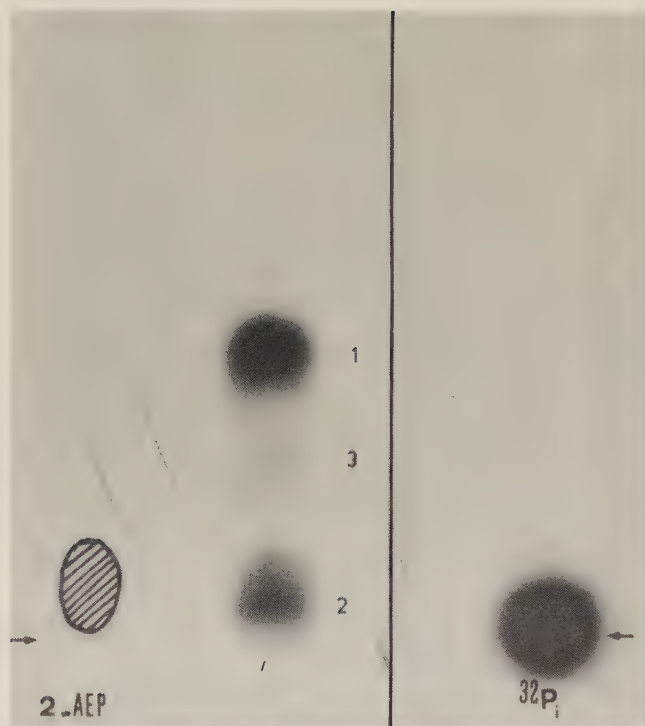


Figure 4 : Autoradiogramme de la chromatographie sur couche mince d'un hydrolysat de foies de rats après injection intrapéritonéale de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$.

$^{32}\text{P}_i$ a été éliminé par chromatographie sur Dowex-50 et Dowex-1.

Solvant : phénol-eau (4:1 v/v).

2-AEP révélé par la ninhydrine.

DISCUSSION

La biosynthèse de phosphonates chez le rat présente un intérêt particulier. En effet, certains protozoaires entrant dans la composition du rumen de boeuf (10) et de chèvre (11), contiennent de l'AEP, ce qui peut expliquer la présence d'AEP dans le cerveau de boeuf (2) et le foie de chèvre (1). D'autant plus que Rosenberg a montré (12) qu'il y avait un échange d'acide 2-aminoéthylphosphonique entre *T. pyriformis* et le milieu environnant. La présence d'AEP dans les tissus humains (3, 4) peut également provenir d'un apport extérieur : d'après Quin (8) on peut ingérer jusqu'à 30 mg de 2-AEP en mangeant quatre palourdes ou huit moules. Les huîtres sont également riches en phosphonates (13, 14). Mais, chez le rat, les phosphonates ne proviennent pas de sa nourriture - "aliment composé complet"*, dont nous connaissons la composition exacte - ni de la flore du tube digestif (15) ou de la flore intestinale (16) lesquelles ne contiennent pas de microorganismes susceptibles de posséder des phosphonates. Il s'agit donc du premier exemple d'une biosynthèse *de novo* de la liaison carbone-phosphore chez un mammifère.

Il faut donc admettre qu'il existe dans le foie de rat un système enzymatique capable de former la liaison C-P. Cette biosynthèse se fait peut-être comme chez *Tetrahymena*, par l'intermédiaire du phosphoénolpyruvate, lequel étant un produit de dégradation de la glycolyse, se trouve en abondance dans le foie.

La biosynthèse *de novo* de phosphonates dans le foie de rat peut expliquer la métabolisation de l'acide 2-aminoéthylphosphonique chez le rat (17, 18).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - M. KANDATSU et M. HORIGUCHI
Agr. Biol. Chem., (1965) 29, 781
- 2 - H. SHIMIZU, Y. KAKIMOTO, T. NAKAJIMA, A. KANAZAWA et I. SANO
Nature, (1965) 207, 1197.
- 3 - J.A. ALHADEFF et G.D. DAVES Jr.
Biochemistry, (1970) 9, 4866.
- 4 - J.A. ALHADEFF et G.D. DAVES Jr.
Biochim. Biophys. Acta, (1971) 244, 211.
- 5 - A.U. ALAM et S.H. BISHOP
Abstr. Div. Biol. Chem., 156ème meeting de l'Am. Chem. Soc., Atlantic City, 9-13 Septembre (1968).
- 6 - J.S. KITTREDGE et R.R. HUGHES
Biochemistry, (1964) 3, 990.
- 7 - M. TAMARI, R. MAGET-DANA, J. MARMOUYET et L. DOUSTE-BLAZY
Biochimie, (1973) 55, 1311.
- 8 - L.D. QUIN
dans Topics in Phosphorus Chemistry (M. Grayson et E.J. Griffith, éditeurs), vol. 4, p. 27, Interscience New-York (1967).

- 9 - J.S. KITTREDGE et E. ROBERTS
Science, (1969) 164, 37.
- 10- R.M.C. DAWSON et P. KEMP
Biochem. J., (1967) 105, 837.
- 11- M. HORIGUCHI et M. KANDATSU
Nature, (1959) 184, 901.
- 12- H. ROSENBERG
Nature, (1964) 203, 299.
- 13- A. HAYASHI, T. MATSUBARA et Y. MISHIMA
J. Fac. Sci. Technol. Kinki Univ. , (1967) 2, 39.
- 14- M. TAMARI et M. KAMETAKA
Agr. Biol. Chem., (1972) 36, 1147.
- 15- E. SACQUET
Symposium International sur l'Avenir des Animaux de Laboratoire, Lyon,
18-20 Septembre(1966), p.41.
- 16- L. COLOBERT
Symposium International sur l'Avenir des Animaux de Laboratoire, Lyon,
18-20 Septembre (1966), p.53.
- 17- J.M. CURLEY et T.O. HENDERSON
Lipids, (1972) 7, 676.
- 18- R. MAGET-DANA, M. TAMARI, J. MARMOUYET et L. DOUSTE-BLAZY
Eur. J. Biochem., (1974) 42, 129.

SECONDE PARTIE

METABOLISME DE L'ACIDE 2-AMINOETHYL- PHOSPHONIQUE DANS LES TISSUS DE MAMMIFERES

CHAPITRE 1

GENERALITES SUR LE METABOLISME

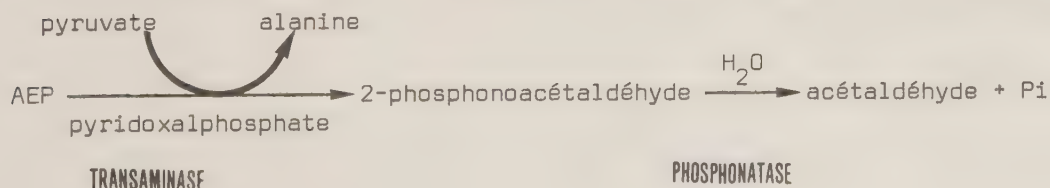
DES PHOSPHONATES

La découverte d'acide 2-aminoéthylphosphonique dans *Tetrahymena pyriformis* (1) a incité de nombreux biochimistes à rechercher si, et comment, les phosphonates étaient utilisés par des organismes vivants sensés être incapables de les biosynthétiser.

L'orientation première de cette recherche a été la croissance de micro-organismes dans des milieux de culture contenant des phosphonates.

C'est en 1963 que Zelenick *et coll* (2) parviennent à cultiver *Escherichia coli* sur des acides méthyl et éthylphosphoniques. La même équipe (3) montre la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* dans un milieu contenant de l'acide méthylphosphonique comme unique source de phosphore. Leurs résultats sont bientôt confirmés par Mastarlez *et coll.* (4), et Harkness (5). Ce dernier montre que la croissance de plusieurs souches bactériennes est la même en présence de phosphate ou d'AEP. Curieusement, il n'observe pas d'incorporation d'AEP dans *Escherichia coli* et ne parvient pas à mettre en évidence une rupture de la liaison C-P. Alam et Bishop (6) étendent cette étude à plusieurs acides organophosphoniques et leur conclusion rejoint celle de Harkness : il n'y a pas d'incorporation de phosphonates dans les cellules d'*Escherichia coli* ni de phosphate formé dans le milieu de culture. D'autre part, ils n'observent pas de transamination du pyruvate par l'acide 2-aminoéthylphosphonique. Une telle transamination est, par contre, mise en évidence par Lacoste et Neuzil (7) chez *Pseudomonas aeruginosa* cultivé dans un milieu contenant de l'AEP comme seule source d'azote et de phosphore. Les travaux importants de Rosenberg et La Nauze (8 - 9) sur le métabolisme des phosphonates dans les micro-organismes les ont conduits à isoler, chez *Bacillus cereus*, une phosphonatase (10) qui coupe la liaison carbone-phosphore.

La molécule d'AEP est dégradée par *Bacillus cereus* de la façon suivante :



La conclusion de ces recherches est que les bactéries n'incorporent pas les phosphonates bien qu'elles puissent les utiliser comme source de phosphore et d'azote.

D'autres études ont été effectuées sur les larves de mouches par Bridges et Ricketts (11) et par Bieber (12). Ces deux équipes ont montré que les larves de mouches incorporent l'AEP (11) et ses dérivés di et triméthylés (12) dans leurs lipides.

Le métabolisme des phosphonates chez les mammifères a été étudié uniquement chez le rat par Kandatsu *et coll.* (13) dès 1965, puis, récemment, par Bjerve (14), Krause *et coll.* (15) et Curley et Henderson (16).

Le travail que nous présentons aide à préciser certains aspects de ce métabolisme.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - M. HORIGUCHI et M. KANDATSU
Nature, (1959) 184, 901.
- 2 - L.D. ZELENICK, T.C. MYERS et E.B. TITCHENER
Biochim. Biophys. Acta, (1963) 78, 546.
- 3 - E.A. JAMES, T.C. MYERS et E.B. TITCHENER
Federation Proc., (1965) 24, 440.
- 4 - P. MASTALERZ, Z. WIECZOREK et M. KOCHMAN
Acta Biochim. Pol., (1965) 12, 151.
- 5 - D.R. HARKNESS
J. Bacteriol., (1966) 92, 623.
- 6 - A.U. ALAM et S.H. BISHOP
Can. J. Microbiology, (1969) 15, 1043.
- 7 - A.M. LACOSTE et E. NEUZIL
C.R. Acad. Sc. Paris, (1969) 269, 254.
- 8 - H. ROSENBERG et J.M. LA NAUZE
Biochim. Biophys. Acta, (1967) 141, 79.
- 9 - J.M. LA NAUZE et H. ROSENBERG
Biochim. Biophys. Acta, (1967) 148, 811.
- 10- J.M. LA NAUZE, H. ROSENBERG et D.C. SHAW
Biochim. Biophys. Acta, (1970) 212, 332.
- 11- R.G. BRIDGES et J. RICKETTS
Nature, (1966) 211, 199.
- 12- L.L. BIEBER
Biochim. Biophys. Acta, (1968) 152, 778.
- 13- M. KANDATSU, M. HORIGUCHI et M. TAMARI
Agr. Biol. Chem., Tokyo, (1965) 29, 779.

- 14- K.S. BJERVE
Biochim. Biophys. Acta, (1972) 270, 348.
- 15- R.F. KRAUSE, K.C.BEAMER et F.J. LOTSPEICH
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1972) 140, 544.
- 16- J.M. CURLEY et T.O. HENDERSON
Lipids (1972) 7, 676.

CHAPITRE 2

METABOLISME DE L'ACIDE 2-AMINOETHYL - PHOSPHONIQUE CHEZ LE RAT

I - INCORPORATION DE L'ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE DANS LES LIPIDES TISSULAIRES DE RAT

Eur. J. Biochem., (1974) 42, 129.

Régine MAGET-DANA, Masato TAMARI, Josette MARMOUYET et Louis DOUSTE-BLAZY

Unité de Recherches sur la Biochimie des Lipides, Hôpital Purpan, Toulouse.

INTRODUCTION

L'acide 2-aminoéthylphosphonique a été identifié dans de nombreux protozoaires et invertébrés marins (1 - 3) mais aussi dans le cerveau de boeuf (4) et des tissus humains (5), ce qui suggère un rôle possible des composés phosphonés (possédant une liaison C-P) dans le métabolisme des mammifères. C'est ainsi que l'acide 2-aminoéthylphosphonate injecté par voie intrapéritonéale (6) ou intraveineuse (7) est incorporé dans les tissus de rat.

D'autre part, Bjerve (8) a mis en évidence une faible incorporation d'acide 2-triméthylaminoéthylphosphonique dans les lipides d'un homogénat de foie de rat.

Nous nous sommes intéressés à l'incorporation de l'acide 2-aminoéthylphosphonate dans les lipides tissulaires de rat et plus particulièrement dans les fractions subcellulaires hépatiques. Cette incorporation a été envisagée *in vitro* et *in vivo* après injection intrapéritonéale d'acide 2-aminoéthyl (³²P) phosphonate.

MATERIEL ET METHODES

- Préparation de l'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate

Nous utilisons, comme source d'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate, les protozoaires *Tetrahymena pyriformis* qui biosynthétisent des composés phosphonés. *Tetrahymena pyriformis*, souche W, est cultivé à 27°C dans le milieu suivant : protéose-peptone (n°4) Difco (20 g/l) ; extrait de levure Difco (5 g/l) ; dextrose (8,5 g/l).

Huit flacons contenant 500 ml du milieu de culture sontensemencés et 2,5 mCi de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ sont ajoutés dans chacun d'eux. Après 72 heures, le milieu est refroidi à 4°C et les cellules collectées par centrifugation à 1000 g pendant 15 minutes.

Le culot est traité par 100 ml de HCl 6 N au reflux (110°C) pendant 24 heures. L'hydrolysate est évaporé à sec plusieurs fois pour éliminer HCl et décoloré par passage sur Norit. L'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate est séparé de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ et purifié par passages sur résines échangeuses d'ions (Dowex-50 H^+ et Dowex-1) selon la méthode de Kittredge et Hugues (9).

La radiopureté d'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate est testée après chromatographie sur couche mince (solvant : n-butanol - acide acétique - eau ; 4:1:2 en vol.).

Le phosphore est dosé par la méthode de Chen *et al.* (10) après minéralisation de l'échantillon par un mélange de HClO_4 et H_2SO_4 pendant 24 heures à 180°C.

Expériences *in vivo*

Un lot de trois rats albinos Wistar, pesant entre 110 et 120 g et placés dans une même cage métabolique, est utilisé pour cette expérimentation. Chacun reçoit par voie intrapéritonéale 0,5 ml d'une solution d'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate ($38\,700\text{ dés} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{gP}^{-1}$) dans NaCl (9 g/l), soit au total 9 635 400 dés/min par injection.

On procède à une seconde injection identique, 24 heures plus tard. Les animaux ont libre accès à la nourriture et à la boisson pendant l'expérimentation et sont sacrifiés 48 heures après la première injection.

Les urines sont collectées toutes les 12 heures, additionnées de 0,5 ml de toluène et leur volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. Les reins, le cerveau et le sang sont prélevés rapidement après décapitation de l'animal. Les organes sont lavés dans du saccharose 0,25 M froid. Le foie est perfusé avec une solution de NaCl (9 g/l) pour éliminer le sang.

Le fractionnement subcellulaire du foie (11) est effectué dans une ultracentrifugeuse Martin-Christ Omikron.

Expériences *in vitro*

Un rat Wistar pesant approximativement 100 g est sacrifié par décapitation. Son foie aussitôt prélevé est lavé par du sérum physiologique et homogénéisé dans un Potter-Elvehjem avec du saccharose 0,25 M (pH 7,4) à raison de 10 ml/g de tissu frais. On élimine les noyaux et les débris cellulaires par centrifugation à 1000 x g pendant 10 min.

Le milieu d'incubation contient : ATP 5 mM, CTP 0,5 mM, $MgCl_2$ 5mM, tampon Tris-HCl 5 mM (pH 7,4), 1,2-dipalmitoylglycérol 5 mM en émulsion dans 3 mg de Tween-20, des quantités variables d'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate (1 080 000 dpm/ μ mole) et l'homogénat correspondant à 0,1g de foie pour un volume total de 1,6 ml.

La réaction a lieu à 37°C et est arrêtée par addition de 1,5 ml d'acide trichloracétique à 66,7 g/l.

- Extraction lipidique

Les lipides sont extraits des tissus par la méthode de Folch *et al.* [12], du sang par la méthode de Rose et Oklander [13].

Hydrolyse ménagée des lipides: les sphingolipides sont obtenus après hydrolyse ménagée des lipides totaux selon la méthode de Dawson [14].

Hydrolyse acide des lipides: afin de mettre en évidence une liaison C-P dans les lipides ceux-ci sont hydrolysés par HCl 6 N au reflux pendant 24 heures.

- Chromatographie sur couches minces

Pour la séparation des phospholipides et des phosphonolipides par chromatographie sur couche mince de silica gel G (Merck, épaisseur 2 mm), nous avons utilisé les solvants suivants :

- 1) chloroforme - méthanol - acide acétique - eau (50:25:7:3 en vol.) [15] ;
- 2) chloroforme - méthanol - acide acétique - eau (75:45:12:6 en vol.) [16] ;
- 3) chloroforme - acide acétique - méthanol - eau (75:25:5:1,8 en vol.) [17] ;
- 4) chloroforme - méthanol - eau (60:35:8 en vol.) [18] ;
- 5) chloroforme - méthanol - acétone - acide acétique - eau (5:1:2:1:0,5 en vol.) [19]
- 6) chloroforme - méthanol - eau (65:25:4 en vol.) [20] ;
- 7) diisobutylcétone - acide acétique - eau (40:25:5 en vol.) [6].

Des témoins de céramide-aminoéthylphosphonate, céramide monométhyl-aminoéthylphosphonate et glycéride-2-aminoéthylphosphonate nous ont été donnés par le Professeur T. Hori (The Department of Chemistry, Faculty of Liberal and Education Shiga, University, Otsu, Shiga, Japon).

- Détermination de la radioactivité

Les composés radioactifs sont détectés sur les chromatogrammes par autoradiographie (films Kodirex). Les spots de radioactivité sont enregistrés par un lecteur de radiochromatoplaques (Philips pw 4007).

Le comptage des échantillons est effectué dans un compteur à scintillation Packard (Tricarb, modèle 3320). Le mélange scintillant comprend 7 g de 2,5-diphényloxazole, 0,3 g de 1,4-bis-2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)-1-benzène et 100 g de naphthalène dissous dans 1 litre de dioxane.

RESULTATS ET DISCUSSION

Expériences *in vivo*

La majeure partie de l'aminoéthyl(³²P) phosphonate excrétée l'est dans les 12 premières heures (Tableau 1). L'élimination 5 fois plus faible d'aminoéthyl (³²P) phosphonate après la seconde injection, alors que l'on s'attendait à une élimination identique à la première, est un fait qui mérite d'être souligné. Le pourcentage total d'aminoéthyl (³²P) phosphonate éliminé dans les urines en 48 heures est faible (23 % de la dose totale injectée).

TABEAU 1 : Excrétion de l'aminoéthyl (³²P) phosphonate dans les urines.

Radioactivité globale retrouvée dans les urines de 3 rats ayant reçu une injection intrapéritonéale d'aminoéthyl(³²P) phosphonate (2,7 μ mol ; 9 635 400 dés/min par injection et pour les 3 rats).

	Temps	$10^{-3} \times$ Radio- activité	Fraction éliminée dans les urines
	h	dés/min	%
1 ^{re} injection	0		
	12	3 565	37
2 ^{de} injection	24	243	2
	36	490	6
	48	265	2

Bjerve (8), après injection intrapéritonéale à un rat d'acide 2-(Me-³H) triméthylaminoéthylphosphonique ou d'acide 3-(Me-³H) triméthylaminopropylphosphonique, retrouve 80 % de la radioactivité dans les urines en 26 heures.

Cependant, Curley et Henderson (7) après injection intraveineuse de (¹⁴C) aminoéthylphosphonate ne retrouvent que 9 % de la radioactivité dans les urines en 72 heures.

- Incorporation d'aminoéthyl (³²P) phosphonate dans les lipides de divers

organes de rat.

Quarante huit heures après une injection intrapéritonéale, l'aminoéthylphosphonate s'incorpore en premier lieu dans les lipides hépatiques (2,45 % de la dose totale injectée) (Tableau 2).

Si les rats sont tués 4 heures seulement après l'injection on obtient des résultats à peu près identiques (2,1 % d'incorporation dans le foie, 0,09 % dans les reins, incorporation négligeable dans le cerveau et le coeur).

TABEAU 2 : Incorporation de l'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate dans les lipides de divers organes de rat.

L'incorporation est mesurée 48 heures après injection intrapéritonéale et concerne la radioactivité globale de 3 rats. On considère que le volume de sang (en ml) est égal à P (en g)/13, P représentant le poids de l'animal.

Organe	10 ⁻³ x Radio- activité totale	Incorporation	Radioactivité spécifique	
	dés/min ⁻¹	%	dés.x min ⁻¹ x g tissu ⁻¹	dés.x min ⁻¹ x µgP ⁻¹
Foie	471,8	2,45	19 660	52
Reins	21,8	0,12	2 725	8
Cerveau	3,1	0,02	520	0
Sang	16,8	0,08	700 ^a	22

^a par ml de sang.

En ce qui concerne l'incorporation dans les reins, on enregistre un comportement différent de l'aminoéthylphosphonate et de l'acide triméthylaminopropylphosphonique pour lequel l'incorporation dans les lipides est maximum entre 4 et 12 heures après l'injection (8).

Pour l'incorporation de l'aminoéthylphosphonate dans les lipides de foie de rat, nos résultats sont comparables à ceux de Kandatsu *et al.* 6. Par contre, Curley *et al.* (7) après une injection intraveineuse d'aminoéthyl (^{14}C) phosphonate obtiennent des incorporations bien supérieures (16 % dans les lipides du foie, 0,6 % dans les reins).

Tous ces résultats indiquent que le foie serait l'organe privilégié pour la biosynthèse des phosphonolipides.

L'acide 2-aminoéthylphosphonique s'incorpore donc dans les lipides tissulaires de rat. Par contre, nous n'avons jamais noté de dégradation de la liaison C-P *in vivo*. En effet, après hydrolyse acide des lipides, nous ne détectons pas de (^{32}P) orthophosphate, mais seulement de l'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate.

- Distribution de l'activité de l'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate incorporé

dans les fractions subcellulaires de foie de rat.

Comme l'indique le Tableau 3, la majeure partie de l'activité de l'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate incorporé dans les lipides du foie se retrouve dans la fraction "1000 x g" (noyaux + membranes cytoplasmiques). Les mitochondries et les microsomes, siège de la biosynthèse des phospholipides pourtant, sont beaucoup moins marqués. Il ne semble pas cependant que la fraction "1000 x g" possède les enzymes nécessaires à la biosynthèse des phosphonolipides, car des expériences *in vitro* ont donné des résultats négatifs. Peut-être y a-t-il eu échange des phosphonolipides entre les divers organites subcellulaires dans les 48 heures après

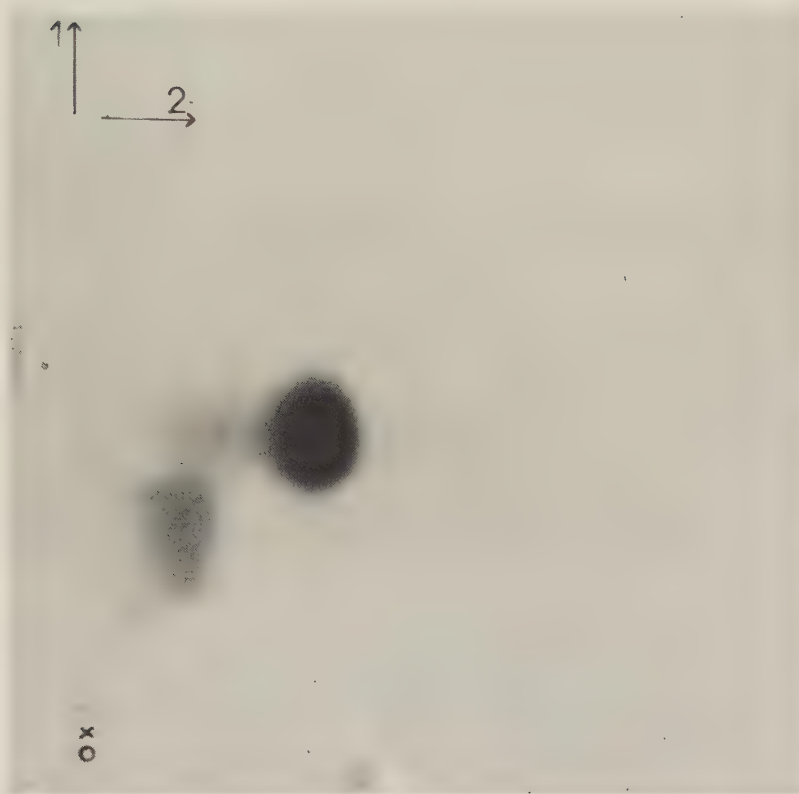


FIGURE 1 : Autoradiogramme d'une chromatographie bidimensionnelle des lipides de
foie de rat, 48 heures après une injection intrapéritonéale d'aminoéthyl
(³²P) phosphonate.

Première dimension : chloroforme - méthanol - eau (65:25:4, en vol.) ;
Deuxième dimension : chloroforme - méthanol - acétone - acide acétique -
eau (5:1:2:1:0,5, en vol.).

l'injection d'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate ?. Cet échange a en effet été démontré pour les phospholipides (21, 22).

TABEAU 3 : Incorporation de l'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate dans les lipides des fractions subcellulaires de foie de rat.

Les valeurs représentent les foies de 3 animaux

Fraction	$10^{-3} \times$ Radio- activité totale	Répartition	Incorporation	Radioactivité spécifique
	dés/min	%	%	dés $\times$ min $^{-1}$ $\times$ μgP^{-1}
"1000 $\times$ g"	358	75,7	1,8	63
Mitochondries	55,9	11,8	0,3	30
Microsomes	57,8	12,3	0,3	36
Surnageant	0	0	0	0

- Identification des phosphonolipides formés

Les analyses ont été effectuées sur les lipides du foie. Après hydrolyse acide des lipides totaux, une chromatographie sur couche mince de l'hydrolysât révèle un seul composé radioactif, l'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate.

Les lipides métabolisés après injection d'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate sont donc bien des phosphonolipides.

Une chromatographie en double dimension des lipides totaux (Fig. 1) révèle trois phosphonolipides différents. Le composé 4, le plus important, migre au même niveau que le glycéride-aminoéthylphosphonate dans plusieurs systèmes chromatographiques et est identifié comme tel. (Fig. 2A). Les composés 2 et 3 (Fig. 2B) résistent à l'hydrolyse alcaline ménagée. Le composé 3 (qui est visible sur l'autoradiogramme mais n'est pas mis en évidence par l'enregistreur du lecteur) a le même comportement chromatographique que le céramide aminoéthylphosphonate.

Le pourcentage des différents phosphonolipides est indiqué dans le Tableau 4.

Le glycéride-aminoéthylphosphonate est le constituant majeur (89 %) mais n'est pas le seul phosphonolipide biosynthétisé contrairement à ce que signalent Curley *et al.* (7). En effet, les sphingophosphonolipides représentent près de 7 % dont 0,1 % pour céramide-aminoéthylphosphonate.

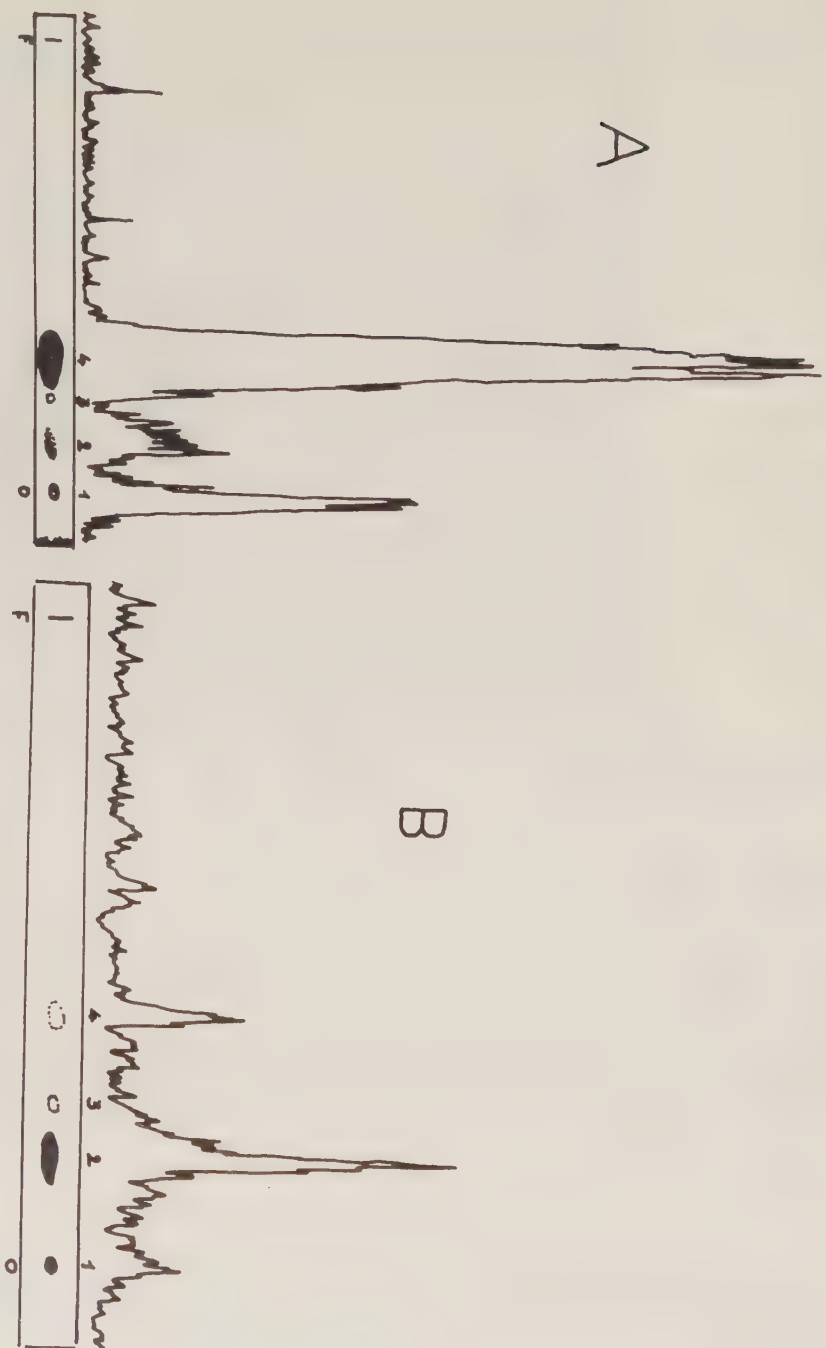


FIGURE 2 : Radiochromatogrammes des phosphonolipides métabolisés dans le foie de rat, 4 heures après une injection intrapéritonéale d'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate.

Solvant : chloroforme - méthanol - eau (65:25:4, en vol.).

(A) : Phosphonolipides totaux. (B) : Sphingophosphonolipides obtenus après hydrolyse alcaline ménagée des phosphonolipides totaux. Le composé 4 est un reste de glycéride-aminoéthylphosphonate non hydrolysé (voir détails dans le texte).

TABLEAU 4 : Distribution de la radioactivité dans les phosphonolipides métabolisés *in vivo* dans le foie de rat.

Chaque rat reçoit, par voie intrapéritonéale, $34,5 \times 10^6$ dés/min d'ami-
noéthyl (^{32}P) phosphonate ($50\,000$ dés $\times$ min $^{-1}$ $\times$ μgP^{-1}). Il est sacrifié 4 heures
plus tard. Les valeurs représentent la radioactivité d'un pool de 3 foies. Les
différentes fractions correspondent aux taches révélées par l'autoradiogramme
(Fig. 2A).

Fraction	Composé	$10^{-3} \times$ Radioactivité dés/min	Répartition %
1	non identifié	83,2	3,8
2	non identifié	148,8	6,8
3	Céramide-aminoéthylphosphonate	2,1	0,1
4	Glycéride-aminoéthylphosphonate	1 952,3	89,3

Expériences *in vitro*

Le tableau 5 montre qu'un homogénat de foie de rat peut incorporer
l'acide 2-aminoéthylphosphonique dans les lipides. Cette incorporation est très
faible (le taux maximum est de $3,5 \cdot 10^{-3}$ % après 60 minutes d'incubation).

TABLEAU 5 : Incorporation de l'ami-
noéthyl(^{32}P) phosphonate dans les lipides d'un
homogénat de foie de rat.

Le milieu d'incubation est décrit dans Matériel et Méthodes. L'ami-
noéthyl (^{32}P) phosphonate ($10,8 \times 10^5$ dés. $\times$ min $^{-1}$ $\times$ μmol^{-1}) est ajouté aux concen-
trations indiquées.

Incubation min	Aminoéthyl- ^{32}P phosphonate μM	Radioactivité dés/min	$10^{-4} \times$ Incorporation %
15	0,46	0	0
15	2,3	43	4,5
60	0,46	76	35
60	2,3	29	3,5

Bjerve (8) rapporte que l'acide 3-triméthylaminopropylphosphonique est incorporé *in vitro* dans les lipides au taux maximum de 2.10^{-6} % après 30 minutes d'incubation.

L'aminoéthylphosphonate, analogue de la phosphoryléthanolamine, serait donc davantage incorporé que les analogues de la phosphorylcholine. Il est vrai qu'il s'agit de l'analogue propylique de la phosphorylcholine et non pas éthylique.

- Action de nucléotides sur l'incorporation de l'aminoéthylphosphonate

dans les lipides *in vitro*.

Le tableau 6 montre que cette incorporation dépend de la présence de nucléotides dans le milieu d'incubation. Le CTP semble nécessaire à la conversion de l'aminoéthylphosphonate en phosphonolipide (en présence de CTP l'activité des lipides est doublée) alors que l'action de l'ATP est beaucoup moins significative.

TABEAU 6 : Action de l'adénosine triphosphate et du cytidine triphosphate sur l'incorporation de l'aminoéthyl (^{32}P) phosphonate dans les lipides du foie de rat *in vitro*.

Le milieu d'incubation comprend : MgCl_2 5mM ; tampon Tris-HCl 5 mM (pH 7,4) ; aminoéthyl (^{32}P) phosphonate ($7,2 \times 10^5$ dés. $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{mol}^{-1}$) 3,2 mM ; homogénat dilué 10 fois, 1 ml pour un volume final de 1,6ml. Les cofacteurs sont ajoutés aux concentrations indiquées. L'incubation dure 15 min à 37°C.

Cofacteur	Radioactivité	Phospholipides formés
	dés/min	μmol
Néant	28	39
ATP 5 mM	38	47
CTP 0,5 mM	54	82
ATP 5 mM + CTP 0,5 mM	91	126

Nous avons intentionnellement choisi les concentrations des cofacteurs de façon à nous placer dans les conditions expérimentales de Kennedy et Weiss (23) lors de leur étude sur l'incorporation de la phosphoryléthanolamine (et phosphorylcholine) dans les lipides de foie de rat.

La comparaison des valeurs consignées dans le tableau 6 aux résultats obtenus par Kennedy (23) met en évidence le parallélisme entre les incorporations de l'aminoéthylphosphonate et de la phosphoryléthanolamine dans les lipides de foie de rat : toutes deux sont dépendantes, dans les mêmes proportions, de la présence de CTP dans le milieu d'incubation.

Des études sont actuellement en cours dans notre Laboratoire pour déterminer le processus biochimique par lequel l'aminoéthylphosphonate est métabolisé en phosphonolipide. Les premiers résultats obtenus (24) indiquent que l'un des composés intermédiaires est le CMP-aminoéthylphosphonate (analogue de la CDP-éthanolamine).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Liang et Rosenberg (25) sur la biosynthèse de la liaison C-P chez *Tetrahymena pyriformis* : ces auteurs ont montré que le CMP-aminoéthylphosphonate est un intermédiaire de la transformation de l'acide 2-aminoéthylphosphonique en phosphonolipide.

Le processus biochimique serait donc le même dans un organisme où se produit une synthèse de la liaison C-P *de novo* que dans des tissus susceptibles d'incorporer des composés phosphonés.

L'incorporation *in vitro* de l'acide 2-aminoéthylphosphonique dans les lipides de foie de rat peut fournir une explication valable aux phénomènes d'inhibition mis précédemment en évidence : en effet l'acide 2-aminoéthylphosphonique se comporte comme un inhibiteur de la biosynthèse des phospholipides à partir de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ *in vitro* (26) et de la décarboxylation de la phosphatidylsérine *in vitro* (27). De plus, certains phosphonates synthétiques sont des inhibiteurs des phospholipases A (28) et C (29).

On peut penser que l'acide 2-aminoéthylphosphonique, et d'autres phosphonates, sont des substrats pour plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme phospholipidique.

Nous remercions le Professeur HORI de l'Université de Shiga (Japon) qui nous a fourni des témoins de phosphonolipides.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - HORIGUCHI, M. et KANDATSU, M.
(1959) Nature (Lond.), 184, 901-902.
- 2 - QUIN, L.D.
(1967) in Topics in Phosphorus Chemistry (Grayson, M. et GRIFFITH, E.J., eds), vol. 4, pp. 27-29, Interscience Publishers, New-York, 1967.
- 3 - KITTREDGE, J.S. et ROBERTS, E.
(1969) Science (Wash.D.C.), 164, 37-42.
- 4 - SHIMIZU, H., KAKIMOTO, Y., NAKAJIMA, T., KANAZAVA, A. et SANO, I.
(1965) Nature (Lond.), 207, 1197-1198.
- 5 - ALHADEFF, J.A. et DAVES G.D. Jr
(1970) biochemistry, 9, 4866-4869.
- 6 - KANDATSU, M., HORIGUCHI, M. et TAMARI, M.
(1965) Agric. Biol. Chem., 29, 779-780.
- 7 - CURLEY, J.M. et HENDERSON, T.O.
(1972) Lipids, 7, 676-679.
- 8 - BJERVE, K.S.
(1972) Biochim. Biophys. Acta, 270, 348-363.
- 9 - KITTREDGE, J.S. et HUGHES, R.R.
(1964) Biochemistry, 3, 991-996.

- 10 - CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. et WARNER, H.
[1956] Anal. Chem., 28, 1756-1758.
- 11 - VIGNAIS, P.M. et NACHBAUR, J.
[1968] Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1473-1480.
- 12 - FOLCH, J., LEES, M. et SLOANE-STANLEY, C.H.
[1957] J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- 13 - ROSE, H.G. et OKLANDER, M.
[1965] J. Lipid Res., 6, 428-431.
- 14 - DAWSON, R.M.C.
[1960] Biochem. J., 75, 45-53.
- 15 - SKIPSKY, V.P., PETERSON, R.F., SANDERS, J. et BARCLAY, M.
[1963] J. Lipid Res., 4, 227-228.
- 16 - SKIPSKY, V.P., PETERSON, R.F. et BARCLAY, M.
[1964] Biochem. J., 80, 374-378.
- 17 - THOMPSON, G.A. Jr
[1969] Biochim. Biophys. Acta, 176, 330-338.
- 18 - FUJINO, Y. et NEGISHI, T.
[1968] Biochim. Biophys. Acta, 152, 428-430.
- 19 - HORI, T.
[1971] Seikagaku, 43, 1-3.
- 20 - HORI, T., ITASAKA, O. et HIDEO, I.
[1966] J. Biochem. (Tokyo), 59, 570-573.
- 21 - Mc MURRAY, W.C. et DAWSON, R.M.C.
[1969] Biochem. J., 112, 91-108.
- 22 - TANIGUCHI, M., HIRAYAMA, H. et SAKAGAMI, T.
[1973] Biochim. Biophys. Acta, 296, 65-70.
- 23 - KENNEDY, E.P. et WEISS, S.B.
[1956] J. Biol. Chem., 222, 193-214.
- 24 - TAMARI, M., MAGET-DANA, R., MARMOUYET, J. et DOUSTE-BLAZY, L.
[1973] Biochimie, 55, 1311-1312.
- 25 - LIANG, C.R. et ROSENBERG, H.
[1966] Biochim. Biophys. Acta, 125, 548-562.
- 26 - DANA, R. et DOUSTE-BLAZY, L.
[1970] Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 405-410.
- 27 - MAGET-DANA, R. et DOUSTE-BLAZY, L.
[1971] Experientia (Basel), 27, 1019-1020.
- 28 - ROSENTHAL, A.F. et CHING-HISIEN HAN, S.
[1970] Biochim. Biophys. Acta, 218, 213-220.
- 29 - ROSENTHAL, A.F. et POUSADA, M.
[1968] Biochim. Biophys. Acta, 164, 226-237.

II - INCORPORATION DE 2-AEP (^{32}P) DANS LA FRACTION HYDROSOLUBLE DE CERTAINS

ORGANES DE RAT, 4 HEURES APRES UNE INJECTION INTRAPERITONEALE.

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'incorporation *in vivo* de l'AEP dans les lipides tissulaires de rat (paragraphe I).

En complément, nous avons analysé la fraction hydrosoluble de certains organes de rat pour y déterminer l'incorporation de l'AEP (^{32}P).

Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 1.

TABEAU 1 : Incorporation de 2-AEP (^{32}P) dans les lipides et dans la fraction hydrosoluble de certains organes de rat, 4 heures après une injection intrapéritonéale.

Ces chiffres représentent les moyennes obtenues pour 3 animaux (les méthodes sont indiquées dans le paragraphe précédent). La fraction hydrosoluble est obtenue par la méthode de Haines et Rose (1). La dose d'AEP injectée à un rat est 34.518.000 dpm (activité spécifique : 1.528.600 dpm/ μmole).

Organes		dpm	% incorporation
Foie	Lipides	729.450	2,1
	Fraction hydrosoluble	2.123.370	5,7
Reins	Lipides	31.670	0,09
	Fraction hydrosoluble	133.940	0,36
Coeur	Lipides	330	< 0,001
	Fraction hydrosoluble	4.150	0,01
Cerveau	Lipides	0	-
	Fraction hydrosoluble	1.280	0,003

Quatre heures après une injection intrapéritonéale, l'acide 2-aminoéthylphosphonique est incorporé surtout dans la fraction hydrosoluble (nous n'avons pas analysé le résidu insoluble).

Curley et Henderson (2) trouvent des résultats inverses : 72 heures après une injection intraveineuse l'incorporation de l'AEP (^{14}C) dans les lipides est de 10 à 20 fois plus élevée -selon l'organe- que dans le résidu délipidé.

Il ne semble pas que le temps écoulé entre l'injection de l'AEP et le sacrifice de l'animal soit un facteur suffisant pour expliquer ces résultats contradictoires.

En effet, comme nous l'avons déjà signalé (paragraphe I) l'incorporation de l'AEP dans les lipides est du même ordre de grandeur, que les rats soient tués 4 heures ou 48 heures après l'injection.

La différence provient peut-être du mode d'injection -intraveineuse et intrapéritonéale- de l'AEP.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - D.S.M. HAINES et C.I. ROSE
Can. J. Biochem., (1970) 48, 885.
- 2 - J.M. CURLEY et T.O. HENDERSON
Lipids, (1972) 7, 676.

III - MISE EN EVIDENCE D'UN DERIVE NUCLEOTIDIQUE COMME INTERMEDIAIRE DE LA BIOSYNTHESE DES PHOSPHONOLIPIDES DANS LE FOIE DE RAT

1 - CMP-AEP : intermédiaire de la biosynthèse des phosphonolipides dans le foie de rat.

Biochimie (1973), 55, 1311-1312.

M. TAMARI, R. MAGET-DANA, J. MARMOUYET et L. DOUSTE-BLAZY

Unité I.N.S.E.R.M. 101 Biochimie des Lipides, Hôpital Purpan - 31052 - TOULOUSE

Plusieurs auteurs ont étudié le métabolisme des composés phosphonés dans les tissus de mammifères (1, 2, 3, 4, 5). On sait en particulier, que l'acide 2-aminoéthylphosphonique est incorporé *in vivo* (1, 3, 5) et *in vitro* (5) dans les lipides de foie de rat.

Il nous a paru intéressant de connaître la voie de biosynthèse des phosphonolipides et, nous appuyant sur les travaux de Kennedy (6), nous nous sommes attachés à démontrer la formation de CMP-AEP, analogue phosphonique de CDP-éthanoline.

MATERIEL ET METHODES

- Animaux

Nous utilisons des rats albinos souche Wistar pesant environ 100 g et provenant de notre élevage particulier.

- Produits

2-AEP(³²P) a été obtenu à partir d'une culture de *Tetrahymena Pyriformis* comme il a été indiqué précédemment (5).

CMP-AEP a été préparé chimiquement par la méthode utilisée par Kennedy (7), pour CDP-éthanoline.

Le charbon Norit a été traité par HCl bouillant puis par de l'eau bouillante jusqu'à élimination totale des ions Cl⁻.

Expériences *in vitro*

Un rat est sacrifié par décapitation et son foie aussitôt prélevé est lavé par du sérum physiologique glacé puis homogénéisé au Potter dans du saccharose 0,25 M tamponné par du Tris-HCl 10⁻³M, pH 7,4.

L'homogénat au 1/10e est centrifugé à 1000 g x 10 min. pour éliminer les débris cellulaires.

Le milieu d'incubation comprend : MgCl₂ 5 mM ; tampon Tris-HCl, pH 7,4 5 mM ; 2-AEP(³²P) 5 μmole (722 300 dpm/μmole) ; homogénat 1 ml pour un volume total de 1,8 ml. Dans certains essais on ajoute du CTP (5.10⁻⁴ M).

Après incubation pendant 15 min. à 37°C, les flacons réactionnels sont placés 3 min. dans l'eau bouillante.

Les protéines sont centrifugées et le surnageant agité avec du Norit qui retient les nucléotides.

Après centrifugation, le surnageant est aspiré et le culot de Norit lavé plusieurs fois par NaCl 0,9 % pour éliminer 2-AEP (^{32}P) résiduel.

Les nucléotides sont extraits du charbon par le mélange éthanol-ammoniaque-eau (60:3:37 v/v) (8).

L'extrait est évaporé à sec et les nucléotides redissous dans 2 ml de méthanol.

Expériences *in vivo*

Deux rats reçoivent une injection intrapéritonéale de 2-AEP(^{32}P) ($62,3 \times 10^5$ dpm ; 107 000 dpm/ μmole) dans 0,5 ml de NaCl à 0,9 %. Les animaux ont libre accès à la nourriture et à la boisson et sont tués par décapitation 24 heures plus tard.

Les foies sont aussitôt prélevés et lavés par du sérum physiologique. Les composés hydrosolubles sont extraits du foie par la méthode de Haines et Rose (9)

Les nucléotides sont fractionnés selon Sundler *et coll.* (10) sur colonne Dowex 1-X₂. On collecte des fractions de 10 ml dont on détermine la radioactivité (sur Packard Tricarb modèle 3320) et l'absorption à 280 nm (spectrophotomètre Beckmann).

- Chromatographie sur couche mince de silicagel G

Nous utilisons les solvants suivants : I : n-butanol-acide acétique-eau (4:1:2 v/v) ; II : acide acétique 0,02 M dans de l'éthanol à 60 % ; III : n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5 v/v) phase supérieure; IV : acide acétique-propanol-eau-phénol (1:2:1:1 v/v).

RESULTATS ET DISCUSSION

Expériences *in vitro*

L'extrait nucléotidique est soumis aux essais suivants :

- Hydrolyse acide par HCl 6N à 110°C pendant 24 heures : un seul composé radioactif est libéré : 2-AEP(^{32}P) identifié après chromatographie de l'hydrolysate sur couche mince de silicagel G (solvant I, témoins 2-AEP et HNa_2PO_4).

- Chromatographie sur couche mince de silicagel G : un autoradiogramme révèle un composé radioactif qui migre comme le témoin de CMP-AEP dans les solvants II, III et IV (témoins CDPE, CMP-AEP, 2-AEP). On note également la présence de 2-AEP(^{32}P) à l'état de traces, ce qui montre que l'AEP est un peu retenu sur Norit.

- Après réunion des extraits correspondant à 8 expériences, on effectue une chromatographie sur couche épaisse (e = 2 mm) (solvant II, témoin CMP-AEP). Le composé radioactif détecté, par autoradiographie et migrant comme CMP-AEP, absorbe en lumière ultraviolette (entre 250 et 300 nm).

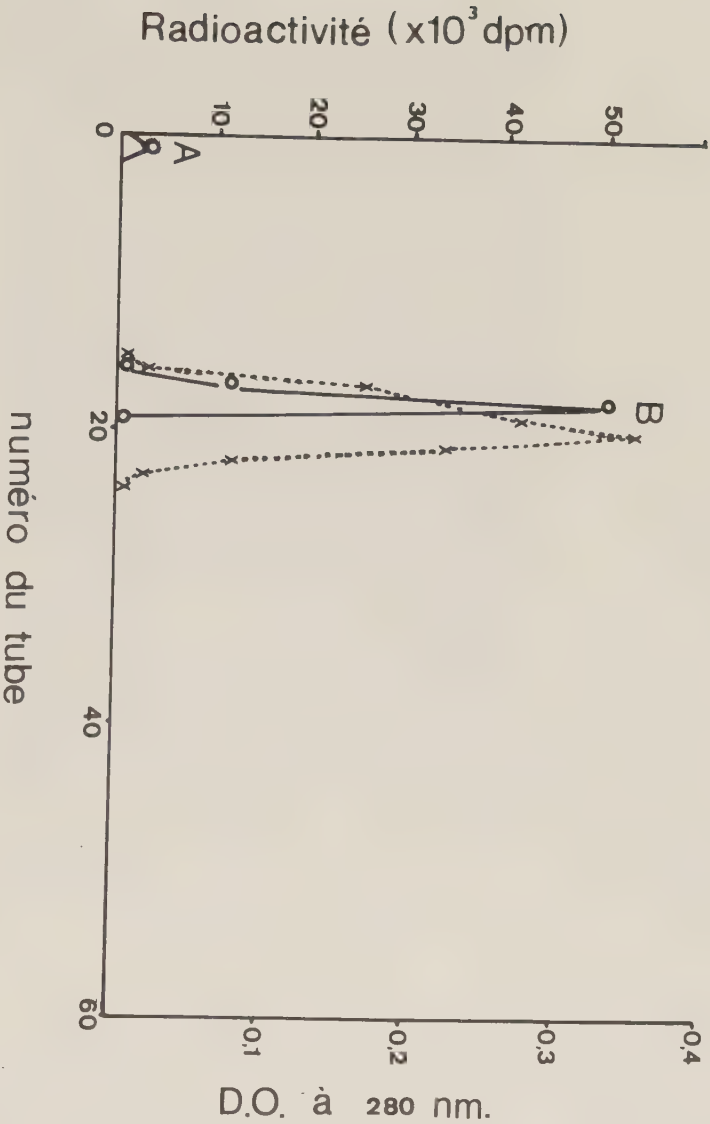


FIGURE 1 : Diagramme d'éluion de la fraction hydrosoluble de foie de rat, 24 heures après une injection intrapéritonéale de 2-AEP (32P).

Chromatographie sur colonne Dewex 1-X₂ forme formiate(0,6 cm x 30 cm). Elution par l'eau puis par un gradient linéaire en normalité d'acide formique de 0 à 0,02 M.

-----X----- D.O. à 280 nm.
———O——— Radioactivité.

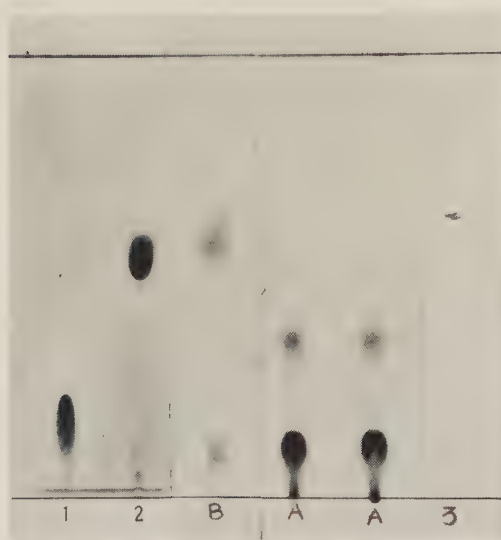


FIGURE 2 : Chromatographie des pics radioactifs élués sur colonne Dowex-1.

Couche mince (0,25 mm) de silicagel G, solvant II.

Témoins révélés à la minhydrine : (1) : 2-AEP ; (2) : CMP-AEP ; (3) : CDPE.

Essais révélés par autoradiographie : (A) premier pic radioactif élué sur Dowex-1 ; (B) deuxième pic radioactif élué sur Dowex-1 (pic d'absorption à 280 nm).

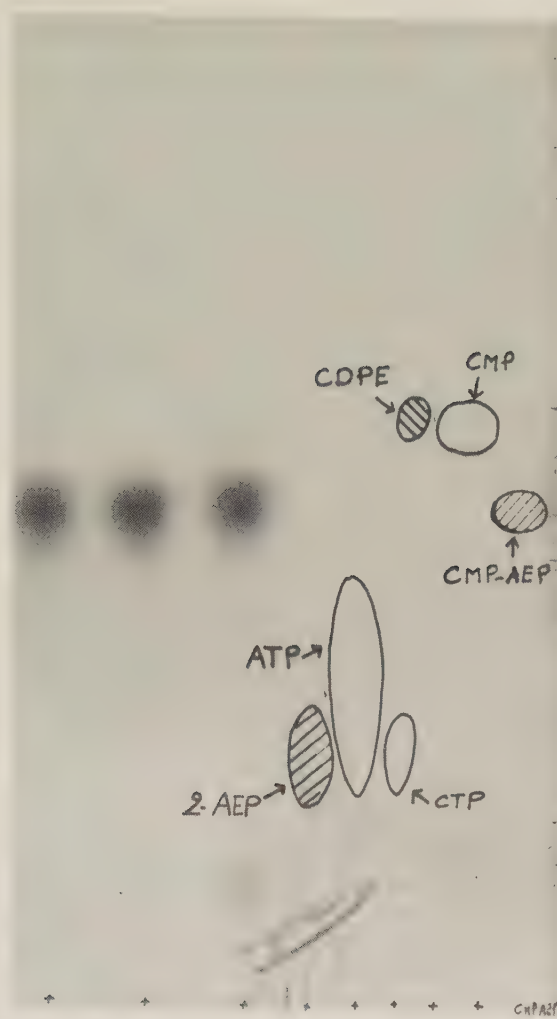


FIGURE 2 Bis : (non mentionnée dans le texte) : Identification de CMP-AEP (^{32}P)
formé in vitro dans un homogénat de foie incubé avec 2-AEP (^{32}P).
Autoradiogramme d'une chromatographie sur couche mince de silica-gel G
solvant II.

- La formation de CMP-AEP est augmentée de 32 % par la présence de CTP dans le milieu d'incubation (Tableau 1).

TABEAU 1 : Formation *in vitro* d'une liaison nucléotidique avec 2-AEP (³²P) dans un homogénat de foie de rat.

Le milieu d'incubation est indiqué dans "Matériel et Méthodes". Le comptage a été effectué après chromatographie sur couche mince pour éliminer les traces de 2-AEP (³²P).

Additions	CMP-AEP (³² P)	
	dpm	nmoles formées
—	36 900	505
CTP 5.10 ⁻⁴ M	48 600	665

Expériences *in vivo*

Deux pics radioactifs sont élués par chromatographie sur Dowex 1-X₂ (fig. 2). Le pic B est situé à l'intérieur du pic d'absorption à 280 nm qui représente les nucléotides (CDP-éthanolamine et CDP-choline) (10). Une chromatographie sur couche mince de silicagel G (solvant II) identifie le pic B à CMP-AEP (fig. 2).

Le pic A contient deux composés radioactifs : 2-AEP(³²P) (qui reste après élution par l'eau) et un composé non identifié qui doit être un dérivé de l'acide 2-aminoéthylphosphonique et dont l'étude sera effectuée ultérieurement.

L'acide 2-aminoéthylphosphonique est donc incorporé *in vivo* et *in vitro* dans le foie de rat par l'intermédiaire d'un dérivé CMP tout comme dans *Tetrahymena Pyriformis* (11) où se produit une synthèse *de novo* de la liaison P-C.

Ces résultats, s'ajoutant à ceux de Bjerve sur des analogues de la phosphorylcholine (2), suggèrent que la biosynthèse des phosphonolipides dans le foie de rat utilise le même système enzymatique que celle des phospholipides (6).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - KANDATSU M., HORIGUCHI M. et TAMARI M.
(1965) Agr. Biol. Chem. Tokyo, 29, 779-780.
- 2 - BJERVE K.S.
(1972) Biochem. Biophys. Acta, 270, 348-363.
- 3 - CURLEY J.M. et HENDERSON T.O.
(1972) Lipids, 7, 676-679.
- 4 - KRAUSS R.F., BEAMER K.C. et LOTSPEICH H.J.
(1972) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 140, 544-547.

- 5 - MAGET-DANA R., TAMARI M., MARMOUYET J. et DOUSTE-BLAZY L.
(1974) Eur. J. Biochem., 42, 129.
- 6 - KENNEDY, E.P. et WEISS S.B.
(1956) J. Biol. Chem., 222, 193-214.
- 7 - KENNEDY, E.P.
(1956) J. Biol. Chem., 222, 185-191.
- 8 - PORCELLATI G. et PIROTTA G.
(1970) Enzymologia, 38, 351-369.
- 9 - HAINES D.S.M. et ROSE C.I.
(1970) Can. J. Biochem., 48, 885-892.
- 10- SUNDLER R., ARVIDSON G. et ÅKESSON B.
(1972) Biochim. Biophys. Acta, 280, 559-568.
- 11- LIANG C.R. et ROSENBERG H.
(1966) Biochim. Biophys. Acta, 125, 548-562.

2 - L'acide 2-aminoéthylphosphonique, substrat pour la phosphoryléthanolamine-cytidylyltransferase de foie de rat.

En collaboration avec Monique PLANTAVID

Il a été démontré que l'acide 2-aminoéthylphosphonique (2-AEP) est incorporé *in vivo* (1-2, 3) et *in vitro* (3) dans les lipides de foie de rat par l'intermédiaire d'un dérivé CMP (4).

Ces résultats autorisaient l'hypothèse que 2-AEP, analogue phosphonique de la phosphoryléthanolamine, pouvait se comporter comme un substrat pour la phosphoryléthanolamine cytidylyltransférase.

MATERIEL ET METHODES

2-AEP (^{32}P) a été obtenu à partir de protozoaires *Tetrahymena pyriformis* souche W cultivés dans un milieu contenant 7 mCi/l de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$. Les cellules sont collectées après 3 jours et hydrolysées par HCl 6N à 110°C pendant 24h. 2-AEP (^{32}P) est purifié par chromatographie sur résines échangeuses d'ions selon Kittredge et Hughes (5).

La fraction enzymatique (CTP : éthanolamine phosphate cytidylyltransférase, EC.2.7.7.14) a été préparée par la méthode de Schneider *et coll.* (6). Un rat Wistar pesant environ 100 g est tué par décapitation. Son foie aussitôt prélevé est homogénéisé au Potter avec du NaCl 0,145 M à raison de 4 ml par gramme de tissu. Le surnageant post-microsomal obtenu après ultracentrifugation sur Spinco (modèle L3-50) (100 000 g x 120 min.) est fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium. La fraction protéique précipitant entre 25 et 38 % de saturation est utilisée sans purification ultérieure pour nos expériences. En effet, Porcellati et Pirotta (7) qui ont étudié cette enzyme dans le cerveau de poulet ont trouvé que la phosphorylcholine cytidylyltransférase (EC.2.7.7.15) présente dans cette fraction n'interfère pas avec la phosphoryléthanolamine cytidylyltransférase.

Les protéines, suspendues dans du Tris-HCl 0,02 M pH 7,5 sont dosées en UV par la méthode de Warburg et Christian (8)

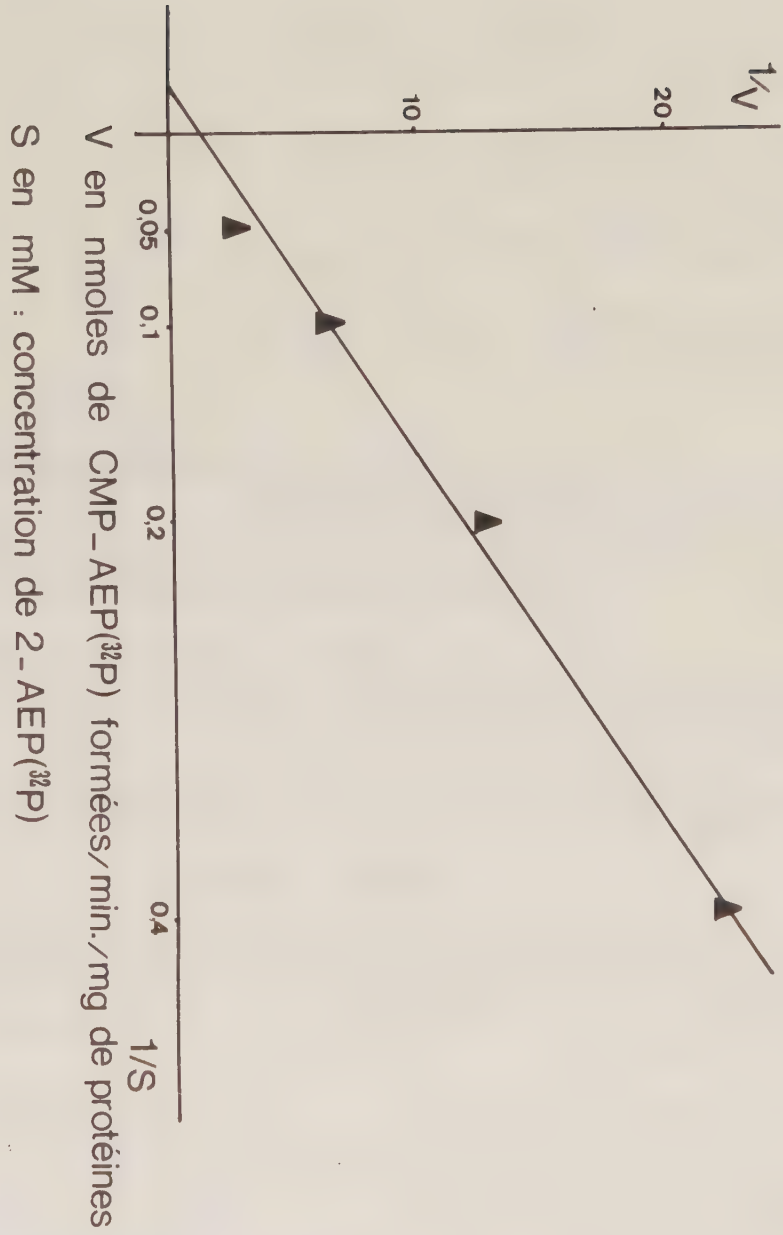


FIGURE 1 : Affinité de la PE-cytidyltransferase pour l'acide 2-aminoéthylphosphonique (courbe de Lineweaver-Burk).

Les conditions expérimentales sont indiquées dans "Matériel et Méthodes".

Le milieu d'incubation (d'après Schneider (6)) comprend : CTP 4 mM, $MgCl_2$ 12 mM, ATP : 2,4 mM ; glycérophosphate 16 mM ; tampon Tris-acide succinique pH6 : 25 mM ; 2-AEP (^{32}P) (116 000 dpm/ μ mole) 2,5 à 20 mM suivant les essais ; enzyme : 8 mg de protéines correspondant à 0,9 g de foie frais, pour un volume total de 1 ml. Après 20 min. d'incubation à 38°C, la réaction est bloquée par addition de 1,5 ml de TCA à 6,67 % à 4°C. Après 15 min. à 4°C, les protéines sont centrifugées à 2000 g x 15 min. et le surnageant est agité avec 2,5 ml d'une solution de Norit (10 mg/ml) qui retient les nucléotides (9). Les nucléotides sont extraits du charbon par l'acide formique concentré.

Leur radioactivité est déterminée sur l'extrait total par scintillation en milieu liquide (Packard Tricarb modèle 3320).

RESULTATS ET DISCUSSION

La PE cytidylyltransférase de foie de rat transforme 2-AEP (^{32}P) en un dérivé nucléotidique (Fig. 1) qui a été identifié précédemment (4) comme CMP-AEP (^{32}P). Le taux de conversion est très faible, environ 0,3 % alors qu'il est de 40 à 50 % pour le passage de phosphoryléthanolamine en CDEPE dans les mêmes conditions expérimentales. Le K_m de l'enzyme pour l'acide 2-aminoéthylphosphonique est approximativement $4 \cdot 10^{-2}M$ alors qu'il est de l'ordre de $1,5 \times 10^{-3}M$ pour la phosphoryléthanolamine. L'enzyme a donc beaucoup moins d'affinité pour l'AEP que pour son substrat normal qui est la phosphoryléthanolamine.

Bjerve (10) qui a étudié l'incorporation de l'acide 2-triméthylaminoéthylphosphonique dans les nucléotides *in vitro* en présence d'une fraction enzymatique enrichie en PC cytidylyltransférase a trouvé un K_m égal à $5,2 \times 10^{-3}M$, alors qu'il est de $3,5 \times 10^{-4}M$ pour la phosphorylcholine. L'écart entre ces deux valeurs est moins important que dans le cas de la phosphoryléthanolamine et de son analogue phosphonique.

Des travaux antérieurs (11) ont montré que l'acide 2-aminoéthylphosphonique est un inhibiteur de la biosynthèse *in vitro* des phospholipides. Le fait qu'il soit un substrat pour la PE cytidylyltransférase peut expliquer son rôle d'inhibiteur compétitif de la phosphoryléthanolamine pour la formation de CDP éthanolamine comme nous le verrons dans la troisième partie de cet ouvrage (page 57).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - M. KANDATSU, M. HORIGUCHI et M. TAMARI
Agr. Biol. Chem. Tokyo, (1965), 29, 779.
- 2 - J.M. CURLEY et T.O. HENDERSON
Lipids, (1972), 7, 676.
- 3 - R. MAGET-DANA, M. TAMARI, J. MARMOUYET et L. DOUSTE-BLAZY
Eur. J. Biochem., (1974) 42, 129.
- 4 - M. TAMARI, R. MAGET-DANA, J. MARMOUYET et L. DOUSTE-BLAZY
Biochimie, (1973), 55, 1311.
- 5 - J.S. KITTREDGE et R.R. HUGHES
Biochemistry, (1964), 14, 121.
- 6 - W.C. SCHNEIDER, W.G. FISCUS et J.A.B. LAWLER
Analytical Biochemistry, (1966), 14, 121.
- 7 - G. PORCELLATI et M.G. PIROTTA
Enzymologia, (1970), 38, 351.

- 8 - D. WARBURG et W. CHRISTIAN
Biochem. Z., (1941), 310, 384.
- 9 - L.F. BORKENHAGEN et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem., (1957), 227, 951.
- 10- K.S. BJERVE
Biochim. Biophys. Acta, (1972), 270, 348.
- 11- R. DANA et L.DOUSTE-BLAZY
Bull. Soc. Chim. Biol., (1970), 52, 405.

3 - Incorporation de CMP-AEP (^{32}P) dans les lipides d'un homogénat de foie de rat

En collaboration avec Josette MARMOUYET

Le métabolisme des phosphonolipides dans le foie de rat admet comme intermédiaire un composé nucléotidique CMP-AEP qui a été identifié (1). Une preuve supplémentaire de cette affirmation est apportée par l'incorporation *in vitro* de CMP-AEP (^{32}P) dans les lipides d'un homogénat de foie de rat.

MATERIEL ET METHODES

CMP-AEP (^{32}P) provient d'expériences préalables sur l'incorporation de AEP (^{32}P) dans les nucléotides d'un homogénat de foie de rat.

Une chromatographie sur couche mince de silicagel G (solvant : Acide acétique 0,02 M dans l'éthanol à 60 %) suivie d'autoradiographie a permis de séparer CMP-AEP (^{32}P) des autres composés nucléotidiques.

CMP-AEP (^{32}P) a été élué du silicagel par du méthanol. La solution méthanolique a été évaporée à sec et CMP-AEP (^{32}P) redissous dans de l'eau distillée.

L'homogénat de foie de rat a été effectué comme il a été indiqué précédemment (1).

Le milieu d'incubation comprend : Tampon Tris-HCl pH 7,4 9.10^{-3} M ; dipalmitate de glycérol $9.5.10^{-3}$ M (émulsionné dans 3 mg de Tween 20) ; MgCl_2 : $5.6.10^{-3}$ M ; CMP-AEP (^{32}P) (71 800 dpm), $3.3.10^{-3}$ M ; homogénat au $1/10^6$ dans du saccharose 0,25 M : 1 ml pour un volume total de 1,42 ml.

Durée de l'incubation : 2 heures à 37° . Les lipides sont extraits par la méthode de Folch (2) et leur radioactivité totale déterminée par scintillation en milieu liquide (compteur Packard-Tricarb modèle 3 320).

RESULTAT ET DISCUSSION

TABEAU : Activité retrouvée dans les lipides d'un homogénat de foie de rat après incubation avec CMP-AEP (^{32}P).

	Activité (dpm)	Taux d'incorporation %
Lipides	235	0,3

Il y a donc incorporation *in vitro* de CMP-AEP (^{32}P) dans les lipides d'un homogénat de foie de rat.

Nous ne connaissons pas la nature du ou des phosphonolipides formés. Il s'agit vraisemblablement de diacylglycéryl AEP (analogue de phosphatidyléthanolamine) dont la biosynthèse était favorisée par la présence de diglycéride dans le milieu d'incubation, et qui, de plus, représente près de 90 % des phosphonolipides métabolisés *in vivo* dans le foie de rat (3).

La formation de céramide-AEP en faible proportion n'est cependant pas à exclure :



en effet, nous avons identifié céramide-AEP (^{32}P) après incorporation *in vivo* de 2-AEP (^{32}P) dans les lipides de foie de rat (3).

CONCLUSION

La voie de biosynthèse des phosphonolipides dans le foie de rat, à partir d'AEP, est donc analogue à celle des phospholipides (4)



Liang et Rosenberg (5) sont parvenus à un résultat similaire pour la biosynthèse *de novo* des phosphonolipides dans *Tetrahymena pyriformis*.

Il reste à déterminer si la formation de phosphonolipides est le résultat d'un défaut de spécificité du système enzymatique intervenant dans la biosynthèse des phospholipides ou, au contraire, si elle est le fait d'enzymes distinctes.

Que l'AEP soit un substrat pour la phosphoryléthanolamine cytidylyltransférase (voir page 51) n'est pas un résultat suffisant pour exclure la seconde hypothèse : l'enzyme a, en effet, été utilisée non purifiée.

Cependant, l'inhibition compétitive de la PE-cytidylyltransférase par l'AEP (voir page 109) est en faveur de la première hypothèse.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - M. TAMARI, R. MAGET-DANA, J. MARMOUYET et L. DOUSTE-BLAZY
Biochimie, (1973), 55, 1311.
- 2 - J. FOLCH, M. LEES et C.H. SLOANE-STANLEY
J. Biol. Chem., (1957), 226, 497.
- 3 - R. MAGET-DANA, M. TAMARI, J. MARMOUYET et L. DOUSTE-BLAZY
Eur. J. Biochem., (1974) 42, 129.
- 4 - E.P. KENNEDY et S.B. WEISS
J. Biol. Chem., (1956), 222, 193.
- 5 - C.R. LIANG et H. ROSENBERG
Biochim. Biophys. Acta, (1966), 125, 548.

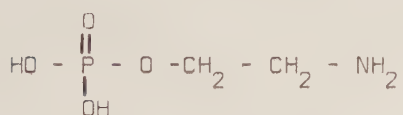
TROISIEME PARTIE

ACTION DE L'ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE

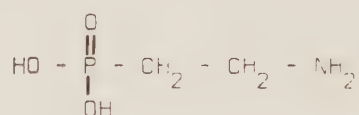
SUR LE

METABOLISME DES PHOSPHOLIPIDES.

Nous avons étudié l'action de l'acide 2-aminoéthylphosphonique sur le métabolisme des phospholipides en raison de l'analogie structurale existant entre ce composé et la phosphoryléthanolamine



phosphoryléthanolamine



2-AEP

La phosphoryléthanolamine est -comme nous le verrons dans le chapitre suivant- un précurseur pour la biosynthèse des phosphatidyléthanolamines, et, par le jeu des conversions entre phospholipides, un précurseur des principaux phospholipides.

Il nous a, dès lors, paru intéressant de déterminer à quelles étapes enzymatiques du métabolisme des phospholipides agissait l'AEP et, dans la mesure du possible, quel était son mode d'action.

CHAPITRE 1

GENERALITES SUR LES PHOSPHOLIPIDES

Les phospholipides sont présents dans toutes les cellules vivantes. Il sont localisés dans les membranes lipoprotéiques où ils jouent un rôle structural important (1).

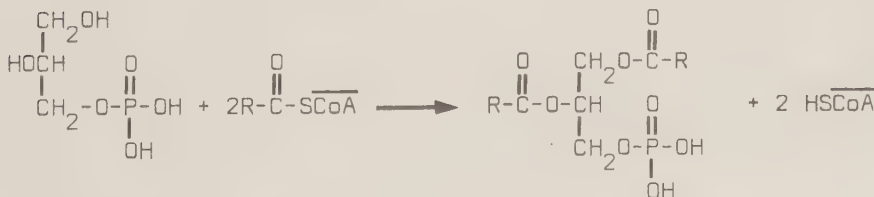
I - BIOSYNTHESE DES PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES

Nous nous limitons à la description sommaire de la voie essentielle de biosynthèse pour chaque phospholipide considéré.

- Acide phosphatidique

Il est peu important quantitativement mais il joue le rôle de précurseur des autres phospholipides.

La principale voie de biosynthèse de l'acide phosphatidique est l'estérification du L- α -glycérophosphate (2).



L- α -glycérophosphate

Acide phosphatidique

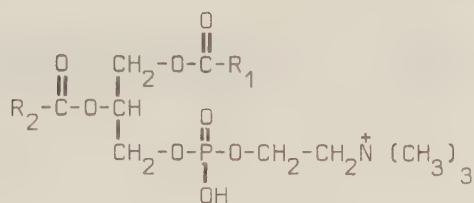
enzyme : acyl - CoA : L - glycérol -3- phosphate -O-acyltransférase
(E.C. 2.3.1.15) distribuée, en particulier dans le cerveau de rat.

Dans le foie de rat, les acides gras saturés sont en position 1 et les insaturés en position 2 (3).

Par ailleurs, on a démontré l'existence dans certains tissus d'une diglycéride-kinase qui, en présence d'ATP, phosphoryle un diglycéride pour donner un acide phosphatidique (4).

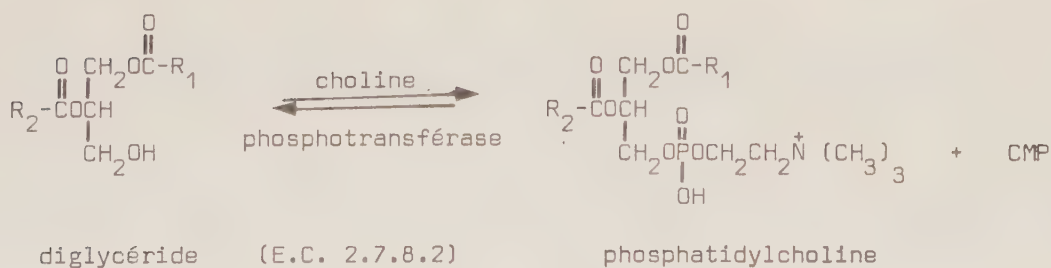
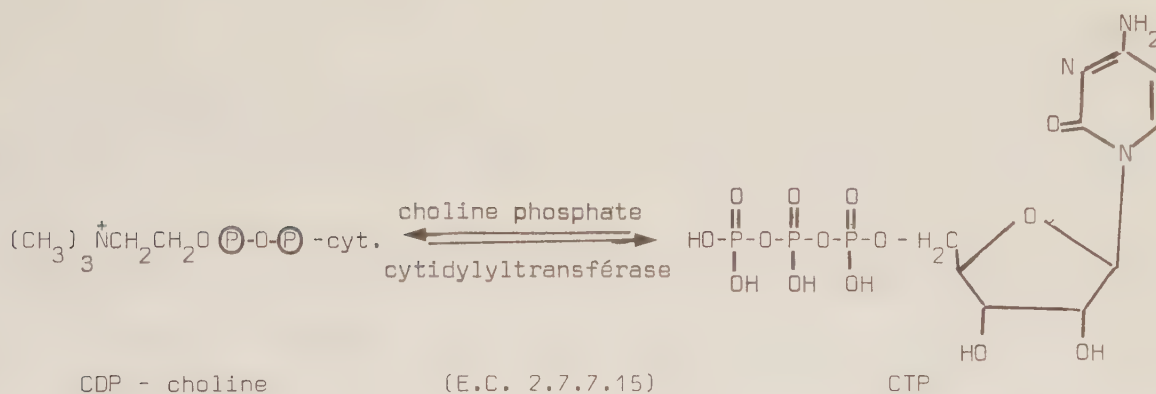
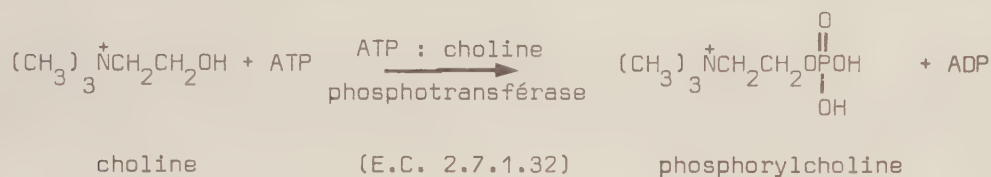
- Phosphatidylcholine (lécithine)

Les phosphatidylcholines -dont la formule suit- constituent le groupe le plus important des phospholipides dans la plupart des cellules animales.



R_1 : chaîne carbonée saturée ; R_2 : chaîne carbonée insaturée (5).

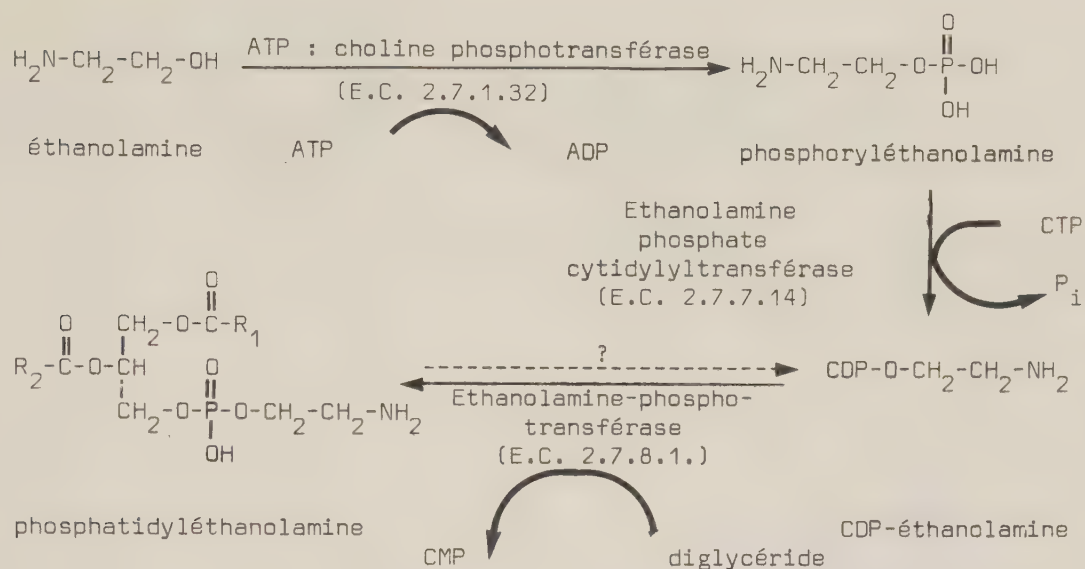
La principale voie de formation, à partir de la choline, a été démontrée par Kennedy et Weiss (6).



La réversibilité de la dernière réaction a été mise en évidence par Bjørnstad et Bremer (7).

- Phosphatidyléthanolamine

La voie de biosynthèse *de novo* des phosphatidyléthanolamines est identique à celle des phosphatidylcholines (6).



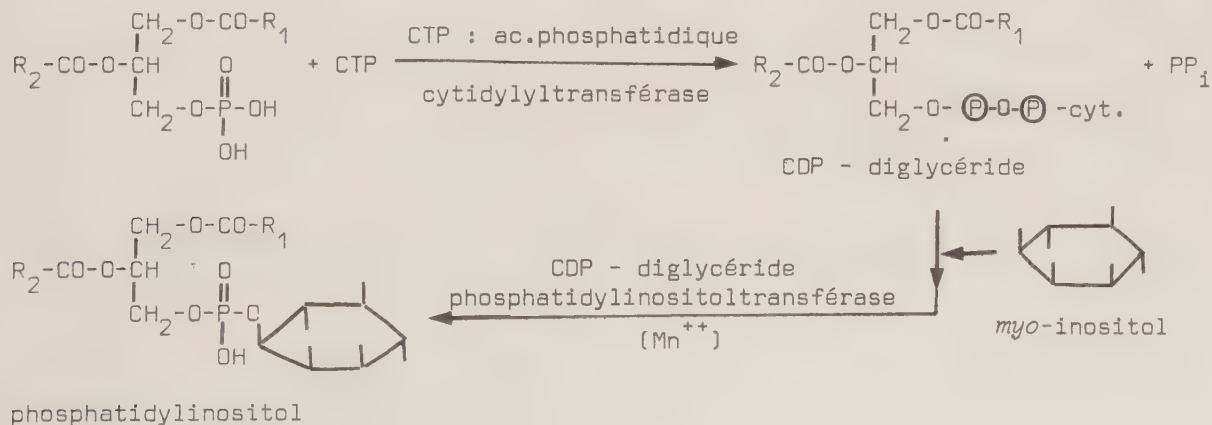
Les phosphorylations de l'éthanolamine et de la choline sont catalysées par la même enzyme (8).

Les acides gras sont distribués comme dans les phosphatidylcholines.

La classe des phosphatidyléthanolamines comprend une proportion non négligeable d'un analogue dans lequel l'acide gras en C₁ est remplacé par un aldéhyde gras lié au groupement hydroxyl du glycérol sous forme d'énol-éther. Ces composés sont appelés plasmalogènes (il existe également des plasmalogènes à choline (9)).

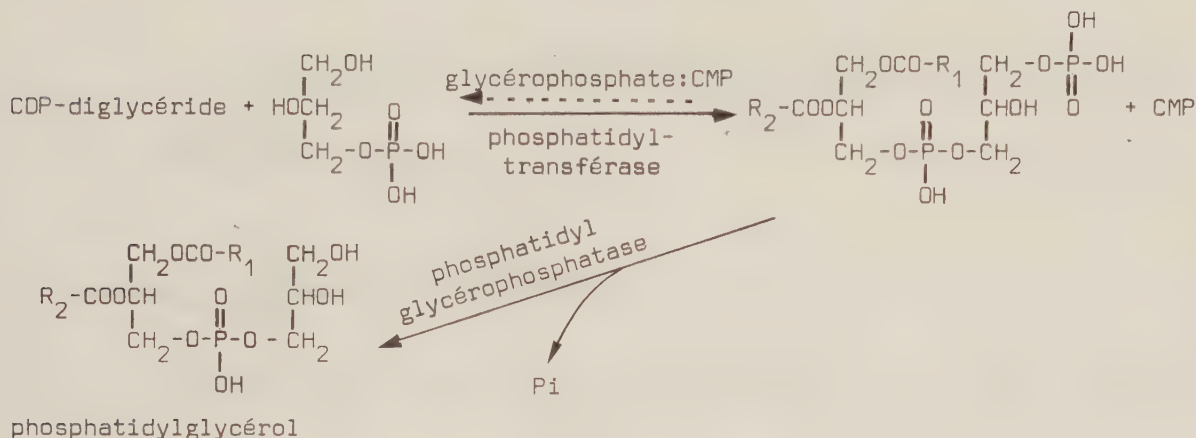
- Phosphatidylinositol

Bien que le CTP joue un rôle important dans la biosynthèse du phosphatidylinositol, le mécanisme réactionnel est très différent de celui impliqué dans la formation des phosphatidyléthanolamines et phosphatidylcholines (10 - 12).



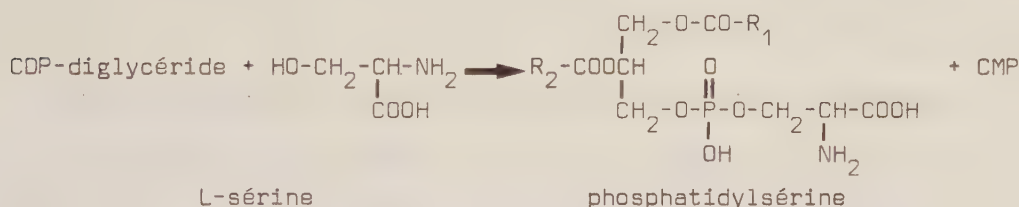
- Phosphatidylglycérol

La biosynthèse du phosphatidylglycérol se fait en particulier dans les mitochondries de foie de rat par les voies suivantes (13) :



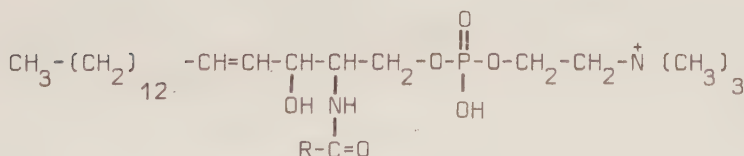
- Phosphatidylsérine

Chez *Escherichia coli* Kanfer et Kennedy (14) ont démontré la biosynthèse *de novo* de la phosphatidylsérine à partir de CDP - diglycérider.

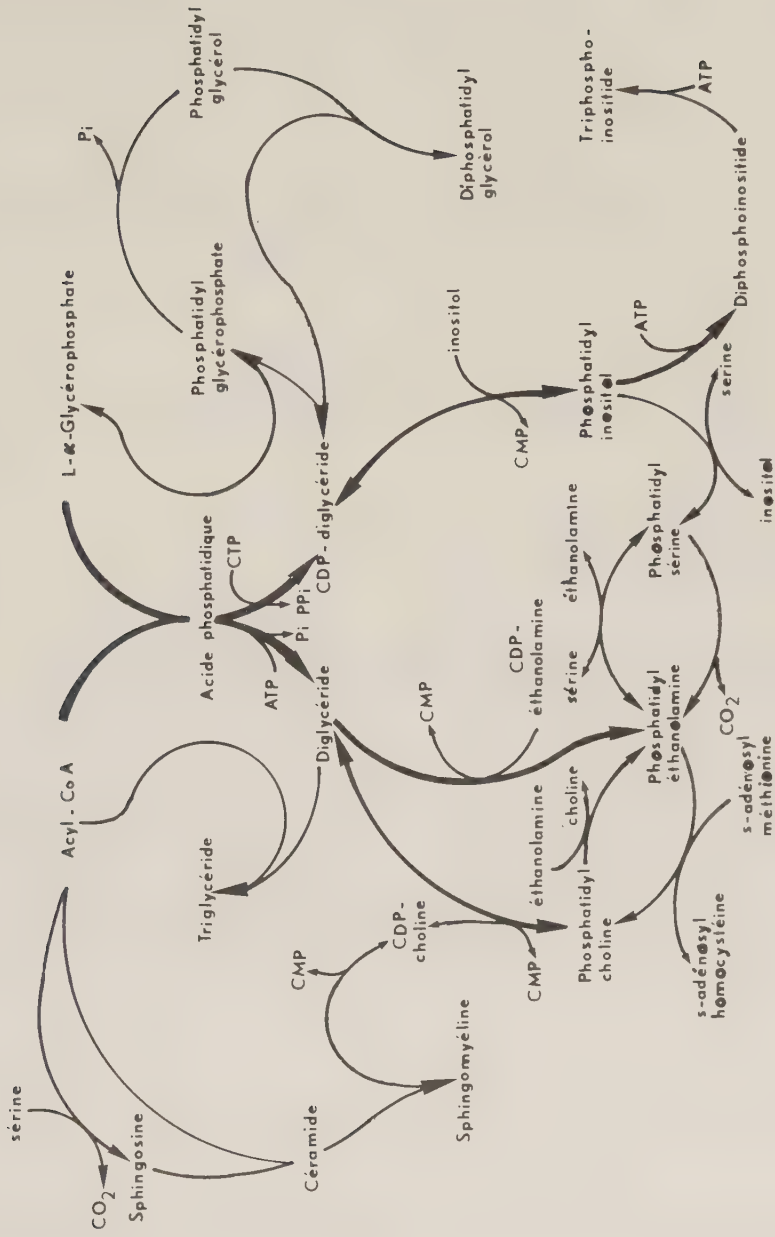


Mais, bien que la phosphatidylsérine représente 5 à 10 % de leurs phospholipides, on n'a pu mettre en évidence une telle séquence dans les tissus animaux. La seule biosynthèse connue pour la phosphatidylsérine est l'échange de L-sérine avec la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine comme nous le verrons dans le chapitre 3.

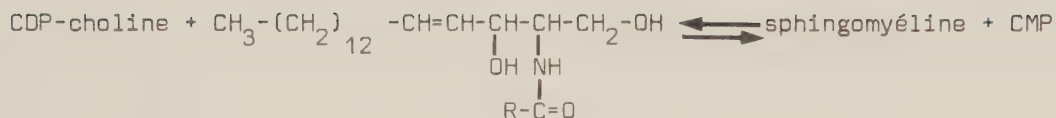
- Sphingomyéline



Pour la synthèse de la sphingomyéline, CDP-choline réagit sur la fonction alcool, non d'un diglycérider, mais d'un N-acylsphingosine (ou céramide) (15).



PRINCIPALES VOIES METABOLIQUES DES PHOSPHOLIPIDES (d'après Thompson (4))



enzyme : CDP-choline : céramide cholinephosphotransférase (E.C. 2.7.8.3.).

II - INTERCONVERSIONS DES PHOSPHOLIPIDES

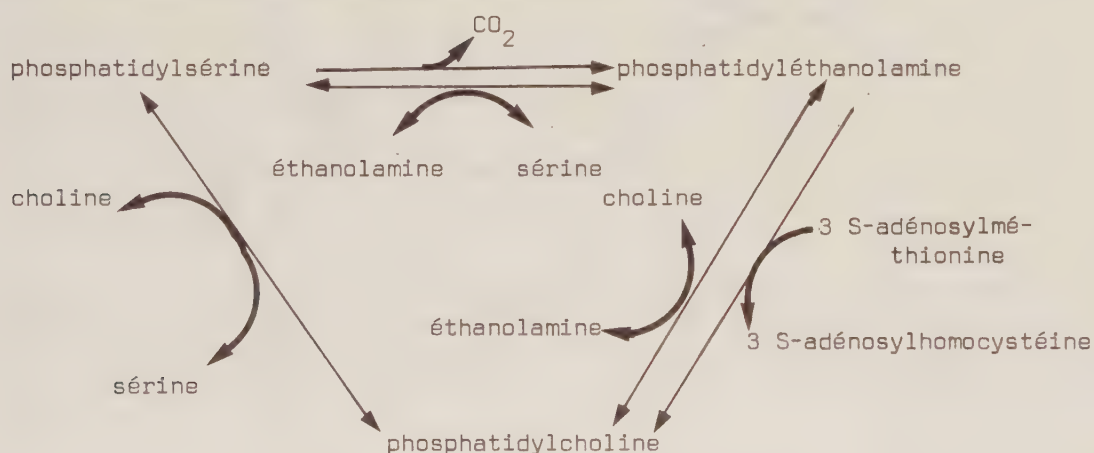
L'hypothèse selon laquelle certains phospholipides peuvent se transformer en un autre type de phospholipides par des réactions impliquant seulement leur base aminée, a été émise pour la première fois par Bremer *et coll.* (16).

Ces réactions sont essentiellement :

- la décarboxylation de la phosphatidylsérine ;
- la méthylation de la phosphatidyléthanolamine ;
- les échanges de bases entre phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et phosphatidylcholine.

Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous :

TABEAU 1 : Interconversions des phospholipides



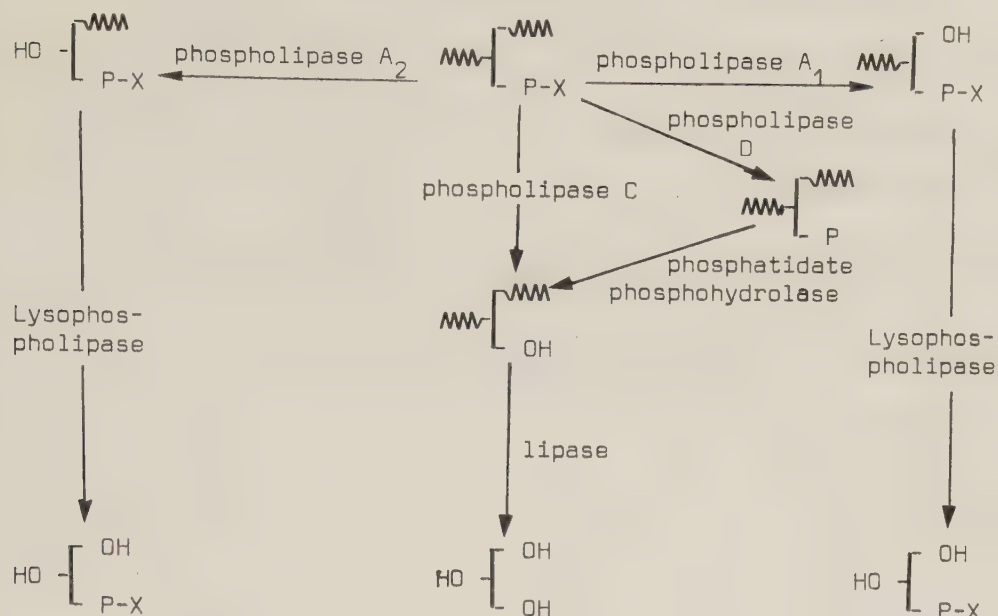
III - CATABOLISME DES PHOSPHOLIPIDES - ACTION DES PHOSPHOLIPASES

Les enzymes responsables de la dégradation des phospholipides sont appelées *phospholipases*. Elles ne sont pas -en général- spécifiques d'un phospholipide mais d'un type de liaison.

Leur action est résumée dans le tableau 2.

La *phospholipase A* (ou A_2) (E.C. 3.1.1.4.) est abondante dans le venin de serpent ; elle a également été mise en évidence dans de nombreux tissus animaux (17). Les activités phospholipasiques A_1 et A_2 ont été séparées dans le foie de rat (18) ; elles sont localisées dans la fraction lysosomale (19) ; l'une hydrolyse la liaison acyl-ester du phospholipide en position 1, l'autre en position 2, pour donner un acide gras et une molécule de 2-ou 1-acyl-lysophospholipide.

TABLEAU 2 : Catabolisme des phospholipides X= choline, éthanolamine, sérine, inositol et peut-être glycérol.



La muqueuse intestinale est particulièrement riche en *lysophospholipase* (E.C. 2.1.1.5) (20). L'hydrolyse de la lysophosphatidylcholine par cette enzyme -qui agit également sur les lysophosphatidyl-éthanolamine et-glycérol (21)- conduit à la formation de glycérophosphorylcholine.

Les sources de *phospholipase C* (E.C. 3.1.4.3) sont essentiellement les toxines de *Clostridium welchii* (22), *Bacillus cereus* et autres bactéries. L'enzyme est activée par les ions Ca^{2+} et hydrolyse aussi la sphingomyéline (il se forme céramide + phosphorylcholine). Par contre, les phosphatidyléthanolamines ne sont hydrolysées qu'en présence de phosphatidylcholines (23) ou de lysophosphatidylcholines (24). Atherton et Hawthorne (25) ont étudié les propriétés d'une phospholipase C présente dans la muqueuse intestinale, agissant surtout sur les phosphoinositides.

La *phospholipase D* (E.C. 3.1.4.4), agit sur tous les phospholipides (21) et catalyse la formation d'acide phosphatidique. Elle a été mise en évidence pour la première fois dans le chou (26) et est surtout présente dans les végétaux supérieurs. Cependant, Kapoor *et coll.* (27) ont étudié récemment l'activité phospholipasique D d'une fraction mitochondriale de foie de rat.

La *phosphatidate phosphohydrolase* (E.C. 3.1.3.4) transforme l'acide phosphatidique en diglycéride (28, 29).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - J.B. FINEAN dans G.B. Ansell, J.N. Hawthorne et R.M.C. Dawson (Eds)
Form and Function of phospholipids Elsevier, Amsterdam (1973) p. 171.
- 2 - A. KORNBERG et W.E. PRICER Jr.
J. Biol. Chem., (1953) 204, 345.
- 3 - F. POSSMAYER, G.L. SCHERPHOF, T.M.A.R. DUBBELMAN, L.M.G. VAN GOLDE et L.L.M.
L.L.M. VAN DEENEN
Biochim. Biophys. Acta, (1969) 176, 95.
- 4 - G.A. THOMPSON Jr. dans G.B. Ansell, J.N. Hawthorne et R.M.C. Dawson (Eds)
Form and Function of Phospholipids Elsevier, Amsterdam (1973) p.69.
- 5 - D.J. HANAHAN et H. BROCKERHOFF dans M. Florkin et E.H. Stotz (Eds)
Comprehensive Biochemistry vol.6, Elsevier, Amsterdam (1965) p.33.
- 6 - E.P. KENNEDY et S.B. WEISS
J. Biol. Chem., (1956) 222, 193.
- 7 - P. BJØRNSTAD et J. BREMER
J. Lipid Res., (1966) 7, 38.
- 8 - J. WITTENBERG et A. KORNBERG
J. Biol. Chem., (1953) 202, 431.
- 9 - L. SVENNERHOLM et H. THORIN
Biochim. Biophys. Acta, (1960) 41, 371.
- 10 - H. PAULUS et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem., (1960) 235, 1303.
- 11 - J.R. CARTER et E.P. KENNEDY
J. Lipid Res. (1966) 7, 678.
- 12 - B.W. AGRANOFF, R.M. BRADLEY et R.O. BRADY
J. Biol. Chem., (1958), 233, 1077.
- 13 - J.Y. KIYASU, R.A. PIERINGER, H. PAULUS et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem., (1963) 238, 2293.
- 14 - J. KANFER et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem., (1964) 239, 1720.
- 15 - M. SBRIBNEY et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem., (1958) 233, 1315.
- 16 - J. BREMER, P.H. FIGARD et D.M. GREENBERG
Biochim. Biophys. Acta, (1960) 43, 477.
- 17 - J.J. GALLAI-HATCHARD et R.H.S. THOMPSON
Biochim. Biophys. Acta, (1965) 98, 128.
- 18 - M. WAITE et L.L.M. VAN DEENEN
Biochim. Biophys. Acta, (1964) 137, 498.
- 19 - R. FRANSON, M. WAITE et M. LA VIA
Biochemistry, (1971) 10, 1942.

- 20- A.F. ROBERTSON et W.E.M. LANDS
Biochemistry, (1962) 1, 804.
- 21- F. HAVERKATE, U.M.T. HOUTSMULLER et L.L.M. VAN DEENEN
Biochim. Biophys. Acta, (1962) 63, 547.
- 22- M.G. MAC FARLANE et B.C. KNIGHT
Biochem. J., (1941) 35, 884.
- 23- L.L.M. VAN DEENEN, G.H. DE HAAS, C.H.Th. HEEMSKERK et J. MEDUSKI
Biochem. Biophys. Res. Commun, (1961) 4, 183.
- 24- T. TAKAHASHI et H.H.O. SCHMID
Chem. Physic Lipids, (1968) 2, 220.
- 25- R.S. ATHERTON et J.N. HAWTHORNE
Eur. J. Biochem, (1968) 4, 68.
- 26- D.J. HANAHAN et I.L. CHAIKOFF
J. Biol. Chem., (1948) 172, 191.
- 27- C.L. KAPOOR, R. PRASAD et N.K. GARG
Biochem. J., (1972) 128, 45 P.
- 28- B. SEDGWICK et G. HÜBSCHER
Biochim. Biophys. Acta, (1965) 106, 63.
- 29- M.E. SMITH, B. SEDGWICK, D.N. BRINDLEY et G. HÜBSCHER
Eur. J. Biochem. (1967) 3, 70.

CHAPITRE 2

ACTION DE L'ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE SUR L'INCORPORATION DE PHOSPHATE (^{32}P) DANS LES LIPIDES

I - INCORPORATION *IN VITRO* DE $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ DANS LES LIPIDES DE COUPES DE CERVEAUX DE
SOURIS, EN PRESENCE D'AEP.

1 - Etude en fonction de la concentration en AEP

Bull. Soc. Chim. Biol., (1970) 52, 405.

Effet de l'acide amino-2-éthylphosphonique sur la biosynthèse *in vitro* des phospho-
lipides cérébraux.

R. DANA et L. DOUSTE-BLAZY

Laboratoire de Biochimie, Centre Anticancéreux _ 31 - Toulouse.

L'acide amino-2-éthylphosphonique (AEP), identifié dans un grand nombre d'organismes marins inférieurs (1-2), entre dans la constitution des phosphonolipides dont l'étude métabolique dans les tissus de mammifères a fait l'objet de peu de travaux. Kandatsu, Horiguchi et Tamari (3) ont montré que l'AEP est incorporé *in vivo* dans deux fractions lipidiques hépatiques.

En présence de coupes de cerveau de souris, l'AEP freine l'utilisation de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ dans la synthèse des acides phosphatidiques, des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylsérines (4) ; une possibilité de compétitivité métabolique entre phospholipides et phosphonolipides a été évoquée. Il nous a paru intéressant d'envisager une telle action antimétabolique de l'AEP en présence d'éthanolamine, précurseur de phosphoryléthanolamine, et d'examiner son influence dans ces conditions sur la synthèse des phospholipides. Cette étude fait l'objet du présent travail.

MATERIEL ET METHODES

- Incubation

Des souris Swiss de la même portée, âgées de 3 à 4 jours sont décapitées; les cerveaux sont aussitôt prélevés, congelés à -20° et découpés en fragments de 300 μ . Chaque essai contient les coupes d'un "pool" équivalent à un cerveau. Les coupes sont mises à incuber pendant 2 heures à 37° en présence de 800 μ Ci de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ et des cofacteurs de la biosynthèse des phospholipides (5 - 6).

- . 10 μ moles de tampon véronal pH 7,4, 10 μ moles d'ATP, 1 μ mol de CTP, 5 μ moles de glycérol ;

- . 40 μ moles de MgCl_2 ;

- . 10 μ moles d'éthanolamine et des quantités variables d'AEP (0 à 20 μ moles).

Le volume final est de 2,3 ml dont 1 ml de saccharose 0,25 M. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml de chloroforme-méthanol (1:2 v/v).

- Extraction et fractionnement des phospholipides

Les essais sont évaporés à sec sous azote ; le résidu est repris quatre fois par 5 ml de chloroforme-méthanol (2:1 v/v) puis purifié selon Folch jusqu'à élimination totale de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ résiduel.

Les phospholipides sont ensuite précipités 12 heures à -20° par 10 ml d'acétone anhydre, redissous dans 1 ml de chloroforme-méthanol (2:1 v/v) et chromatographiés sur couche mince de silicagel H basique (chloroforme-méthanol-acide acétique-eau 25:15:4:2 v/v) (7).

Chaque fraction phospholipidique révélée par les vapeurs d'iode est grattée, éluee par 2 fois 10 ml de chloroforme-méthanol en proportions variables (9:1 v/v pour les acides phosphatidiques, 4:1 v/v pour les céphalines, 5:4 v/v pour les lécithines).

Le volume de chaque éluat est ramené à 3 ml.

Les acides phosphatidiques sont purifiés par une seconde chromatographie sur couche mince de silicagel H neutre (solvant : chloroforme-méthanol-acide acétique-eau 80:13:8:0,3 v/v) (8).

- Détermination de l'activité spécifique des fractions phospholipidiques

L'activité est déterminée sur une partie aliquote de l'extrait méthanol-chloroforme par un compteur à scintillation Packard Tricarb 3003 (*) en utilisant 10 ml de mélange scintillant (1 volume d'eau pour 5 volumes de dioxane contenant 10 p.100 de naphthalène, 0,03 p. 100 de diméthyl-1, 4 bis-2(4-méthyl-5-phényloxazolyl) benzène et 0,7 p. 100 de diphenyloxazole). Le phosphore est dosé par la méthode de CHEN *et coll.* (9) sur une autre partie aliquote.

En raison de leurs faibles proportions, les acides phosphatidiques ne sont pas élués ; les taches correspondantes de silicagel sont prélevées. La

(*) Cet appareil a été mis à notre disposition par le Professeur Caujolle (Centre de Toxicités du C.N.R.S.).

radioactivité est déterminée par un passeur d'échantillon automatique, Tracerlab(*) et le phosphore dosé comme précédemment.

RESULTATS

Action de l'acide amino-2-éthylphosphonique sur l'incorporation du $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ dans les phosphatidyléthanolamines et dans les phosphatidylcholines de cerveau.

La figure 1 A, représentative de cinq expériences, montre que, à des concentrations variables, l'AEP ralentit l'incorporation de ^{32}P i dans les deux groupes de phospholipides cérébraux.

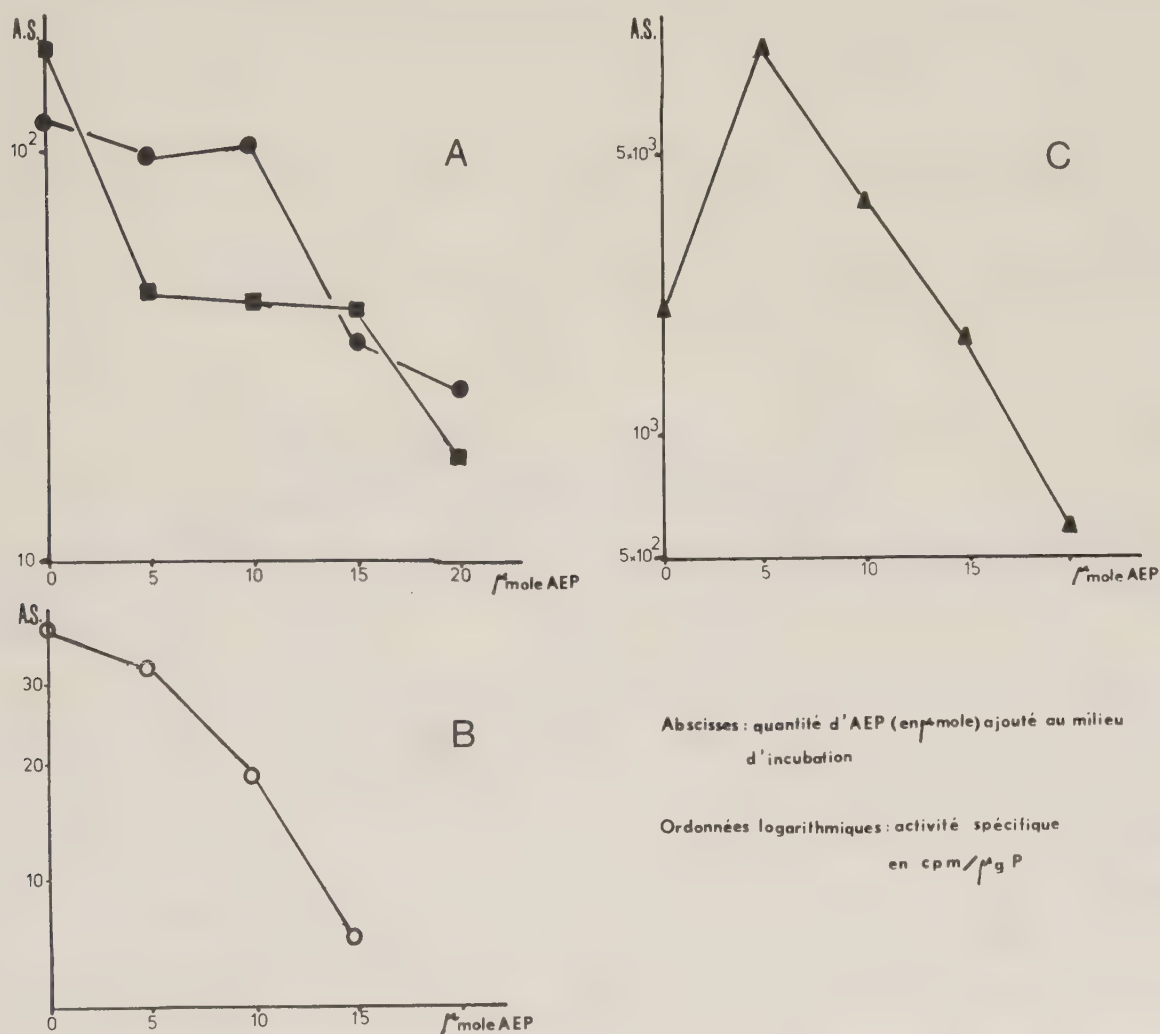


FIGURE 1 : Action de l'acide amino-2-éthyl-phosphonique sur l'incorporation *in vitro* de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ dans les phospholipides de cerveau de souris.

A- ●- phosphatidyléthanolamines ; ■- phosphatidylcholines ; B- Acides phosphatidiques ; C- Phosphatidylsérines.

(*) Cet appareil a été mis à notre disposition par le Professeur Rico (Ecole Vétérinaire).

Le renouvellement des phosphatidyléthanamines est peu modifié malgré l'addition de 5 et 10 μ moles d'AEP, mais en présence de 15 et 20 μ moles il diminue en moyenne respectivement de 78 p. 100 et 79 p. 100 (figure 2).

L'action de l'AEP sur la biosynthèse des phosphatidylcholines est comparable, mais elle s'exerce à des concentrations différentes: 5 μ moles d'AEP suffisent à réduire l'incorporation de ^{32}P i de 72 p. 100 tandis qu'en présence de 20 μ moles d'AEP le renouvellement de phosphatidylcholines devient près de dix fois moins important (figure 1 A). L'incorporation de ^{32}P i dans les molécules phospholipidiques est davantage inhibée lors de la biosynthèse des phosphatidylcholines que lors de celle des phosphatidyléthanamines.

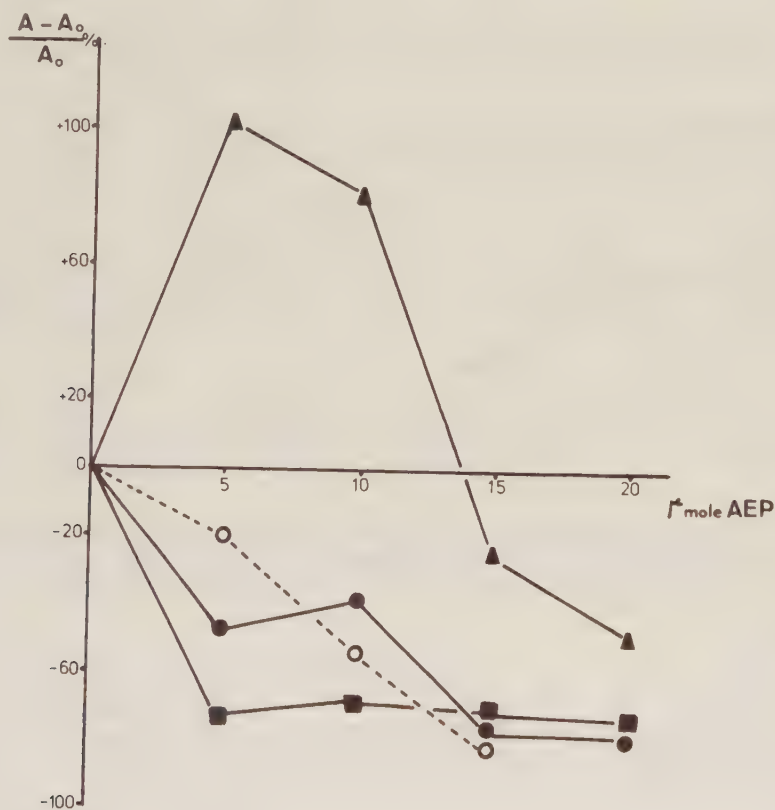


FIGURE 2 : Variations relatives de l'activité spécifique des phospholipides en fonction de la quantité d'AEP dans le milieu d'incubation.

$\frac{A - A_0}{A_0}$ = variation relative de l'activité spécifique de l'essai considéré par rapport à l'activité spécifique de l'essai sans AEP.

A : activité spécifique de l'essai considéré ; A_0 : activité spécifique de l'essai ne contenant pas d'AEP.

...o... Ac. Phosphatidiques ; ●- Phosphatidyléthanamines ; ▲- Phosphatidylsérines ; ■- Phosphatidylcholines.

(Ces graphiques représentent la moyenne des résultats obtenus pour les différentes expérimentations).

- Action de l'acide amino-2-éthylphosphonique sur l'incorporation de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ dans les acides phosphatidiques de cerveau.

La figure 1 B, représentative de trois expériences indique un ralentissement du "turnover" des acides phosphatidiques en présence d'AEP ; ce ralentissement est proportionnel à la quantité d'AEP mis en jeu ; pour une concentration de 15 μmoles d'AEP dans le milieu d'incubation, l'inhibition atteint 82 p.100.

- Action de l'acide amino-2-éthylphosphonique sur l'incorporation du $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ dans les phosphatidylsérines.

Pour des quantités faibles d'AEP (5 μmoles) on observe une augmentation de l'incorporation de ^{32}Pi dans les molécules de phosphatidylsérines, dont l'activité spécifique passe de 2250 à 7650 cpm/ μg P, soit une activation de 250 p. 100 (Figure 1 C).

Au-dessus de 10 μmoles , l'AEP exerce la même action freinatrice qu'à l'égard de la biosynthèse des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylcholines puisqu'en présence de 20 μmoles d'AEP le renouvellement est réduit de 50 p. 100.

La figure 2 montre que l'influence de l'AEP la plus significative sur l'ensemble des phospholipides étudiés s'exerce pour une concentration de 10 μM d'AEP.

DISCUSSION

L'AEP empêche l'utilisation du ^{32}Pi dans la biosynthèse des acides phosphatidiques, des phosphatidylcholines et des phosphatidyléthanolamines.

La liaison covalente carbone-phosphore suggère une possibilité de compétitivité métabolique entre les phospholipides et les phosphonolipides. Nous avons constaté (4) que l'AEP ajouté au milieu de biosynthèse des phospholipides en présence de coupes de cerveau et de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ n'est pas incorporé sous forme de phosphonolipides.

La dissociation des effets de l'AEP sur la biosynthèse des divers phospholipides laisse entrevoir plusieurs mécanismes possibles.

L'inhibition de la formation des acides phosphatidiques, des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylcholines pourrait être en relation avec la formation d'un complexe entre l'AEP et un cofacteur de la biosynthèse des phospholipides, tels que Mg^{++} , ce qui serait en accord avec ce que l'on sait du pouvoir chélateur des composés phosphoniques (11 - 12).

Par un mécanisme comparable l'augmentation de l'activité spécifique des phosphatidylsérines pourrait être due au blocage de la phosphatidylsérine-décarboxylase. Les expériences en cours avec la ^{14}C -sérine permettront d'étayer cette hypothèse.

D'autre part, la décarboxylation de la sérine peut avoir lieu au sein de la molécule de sphingomyéline. Henning et Stoffel (13) ont montré que la totalité du tritium de la ^3H -sphingosine est localisée dans l'éthanolamine et la choline des phospholipides correspondants.

L'AEP interviendrait-il en permettant la formation de céramide-amino-éthylphosphonate qui a été décelée seulement dans des organismes aquatiques (14) ?.

Aucun des mécanismes suggérés au cours de cette discussion n'est vérifié pour le moment.

* Nous pouvons ajouter que l'ensemble de toutes les expériences effectuées (durée d'incubation 2 heures) a permis de déterminer approximativement la concentration en AEP (5 mM) limite entre les effets d'activation et d'inhibition pour le marquage de la phosphatidylsérine.

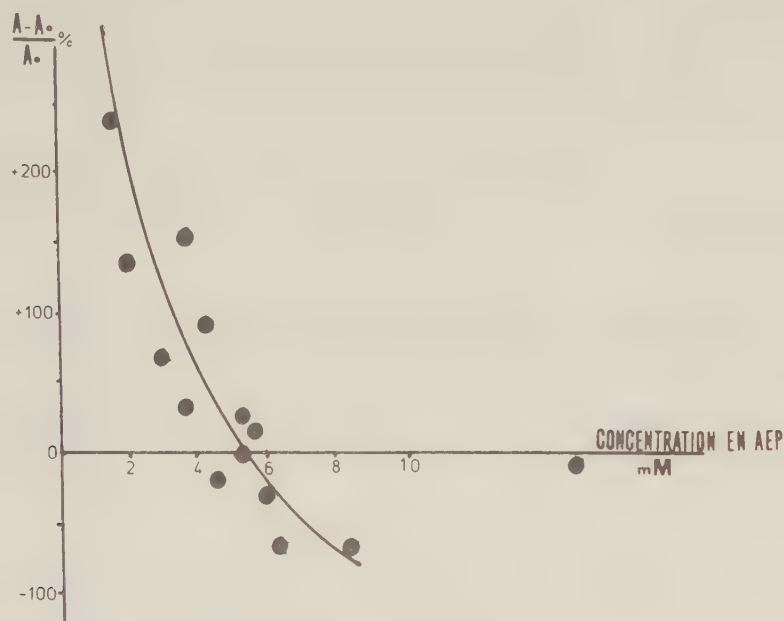


FIGURE 3 : Variations relatives de l'activité spécifique de la phosphatidylsérine (^{32}P) en fonction de la concentration en AEP dans le milieu d'incubation

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - KITTREDGE, J.S., ROBERTS, S. et SIMONSEN, D.G.
Biochemistry, (1962) 1, 624.
- 2 - HORI, T., ITASAKA, O., HASHIMOTO, T., INOUE, H. et YAMADA, K.
J. Biochem., (1964) 56, 477.
- 3 - KANDATSU, M., HORIGUCHI, M. et TAMARI, M.
Agr. Biol. Chem., (1965) 29, 779.
- 4 - DANA, R. et DOUSTE-BLAZY, L.
C.R. Acad. Sc. Paris, (1969) 268, 185.
- 5 - KENNEDY, E.P.
J. Biol. Chem., (1953) 201, 399.
- 6 - KENNEDY, E.P. et WEISS, S.B.
J. Biol. Chem., (1956) 222, 193.
- 7 - SKIPSKY, V.P., PETERSON, R.F. et BARCLAY, M.
Biochem. J., (1964) 80, 374.

- 8 - SKIPSKY, V.P., BARCLAY, M., REICHMAN, E.S. et GOOD, J.J.
Biochim. Biophys. Acta, (1967) 137, 80.
- 9 - CHEN, P.S. Jr., TORIBA, T.Y. et WARNER, H.
Anal. Chem., (1956) 28, 1756.
- 10- HUBSCHER, G., DILS, R.R. et POVER, W.F.R.
Biochim. Biophys. Acta, (1959) 36, 518.
- 11- SCHWARZENBACH, G., ACKEMANN, H. et RUCKTUHL, P.
Helv. Chim. Acta, (1949) 32, 1175.
- 12- CASSAIGNE, A., LACOSTE, A.M. et NEUZIL, E.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1967) 49, 1813.
- 13- HENNING, R. et STOFFEL, W.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., (1969) 350, 827.
- 14- HORI, T., ARAKAWA, I. et SUGITA, M.
J. Biochem., (1967) 62, 67.

2 - Influence du temps d'incubation sur l'action de l'AEP

Nous avons fait varier le temps d'incubation de 30 minutes à 5 heures pour suivre l'évolution du marquage des phospholipides.

MATERIEL ET METHODES

Les coupes d'un cerveau de souris de 4 jours sont incubées dans le milieu suivant : tampon véronal 13 mM (pH 7,4), tampon tris-HCl 33 mM (pH 7,4), $MgCl_2$ 20 mM, ATP 5 mM, CTP 0,5mM, phosphate (^{32}P) 400 μCi (0,6 $\mu mole$) ; l'AEP est ajouté selon les essais à la concentration de 4,5 mM. Le volume total est 1,95 ml dont 1 ml de saccharose 0,25M.

Dans les essais incubés pendant 5 heures nous avons ajouté 100 Unités de pénicilline et 100 μg de streptomycine par ml.

Les méthodes expérimentales sont décrites dans le paragraphe précédent (I-1).

RESULTATS

Ainsi que le montre la Figure 4, l'action de l'AEP sur l'activité spécifique des phosphatidyléthanolamines, phosphatidylcholines et acides phosphatidiques ne varie pas si on augmente la durée d'incubation

Par contre, pour les phosphatidylsérines, tout se passe comme si -pour une concentration en AEP de 4,5 mM- il se produisait une accumulation de phosphatidylsérine radioactive au cours du temps.

Ce résultat admet comme hypothèse l'inhibition de la décarboxylation de la phosphatidylsérine par l'AEP. ($PS \longrightarrow PE + CO_2$), hypothèse que nous étudierons plus loin (Chap. 3, Paragr. 3).



Figure 4 : Influence du temps d'incubation sur les variations relatives d'activités spécifiques des phospholipides, provoquées par la présence d'AEF (4,5mM) dans le milieu d'incubation.

-▲-▲- PS ; -■-■- PE ; -○-○- AP ; -●-●- PC
(moyenne de 3 expériences).

3 - Comparaison entre les actions de la phosphoryléthanolamine et de l'AEF sur l'incorporation de phosphate (^{32}P) dans les lipides de coupes de cerveaux de souris.

METHODES

Les coupes de cerveaux de souris sont incubées dans le milieu suivant : tampon véronal 10 mM (pH 7,4); MgCl_2 8mM; ATP 2 mM ; CTP 0,2 mM ; phosphate (^{32}P) 400 μCi , 0,6 μmole ; phosphoryléthanolamine ou AEP sont ajoutés selon les essais à la concentration de 8 mM. Le volume total est 2,5 ml dont 1 ml de saccharose 0,25 M.

La durée de l'incubation est de 2 heures à 37°C.

Les méthodes expérimentales sont décrites dans le paragraphe I-1. La radioactivité est déterminée par un passeur d'échantillon automatique "Tracerlab".

RESULTATS

On note , (Fig. 5) en présence de phosphoryléthanolamine , une diminution de l'incorporation de phosphate (^{32}P) dans les lipides. Cette diminution semble comparable à celle provoquée par l'AEP pour les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylcholines.

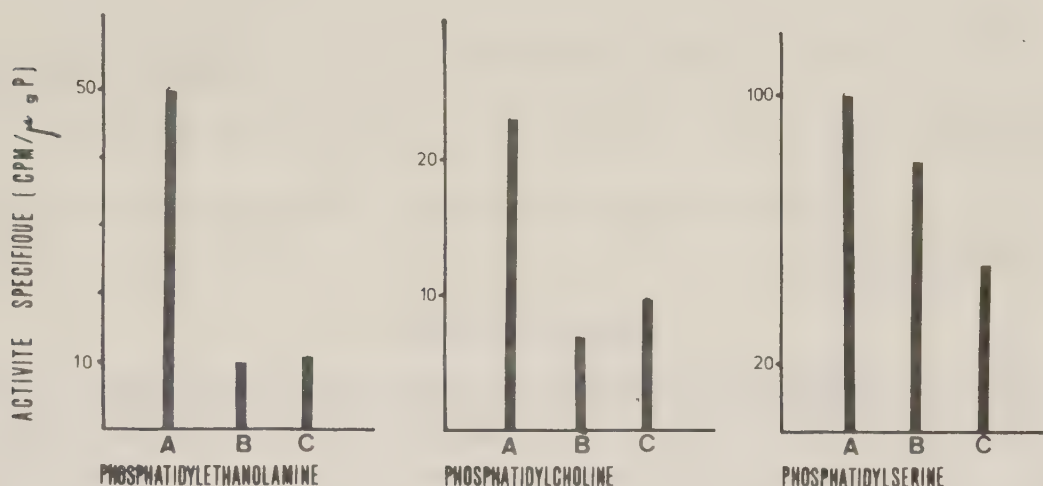


Figure 5 : Activités spécifiques des phospholipides de coupes de cerveaux de souris après incubation avec du phosphate (^{32}P).

A : essai témoin ; B : en présence d'AEP (8 mM) ; C : en présence de phosphoryléthanolamine (8 mM).

La cause doit, cependant, en être différente. Il s'agit probablement d'une dilution isotopique provoquée par l'incorporation de phosphoryléthanolamine non marquée dans les lipides. Ce phénomène est d'autant plus important que la phosphoryléthanolamine est en excès par rapport au phosphate (^{32}P) (concentration 30 fois supérieure). Cette dilution isotopique se répercute ensuite sur les phosphatidylcholines et les phosphatidylsérines, à un degré moindre car le phosphate (^{32}P) s'incorpore dans les phosphatidylcholines (Fig. 6).

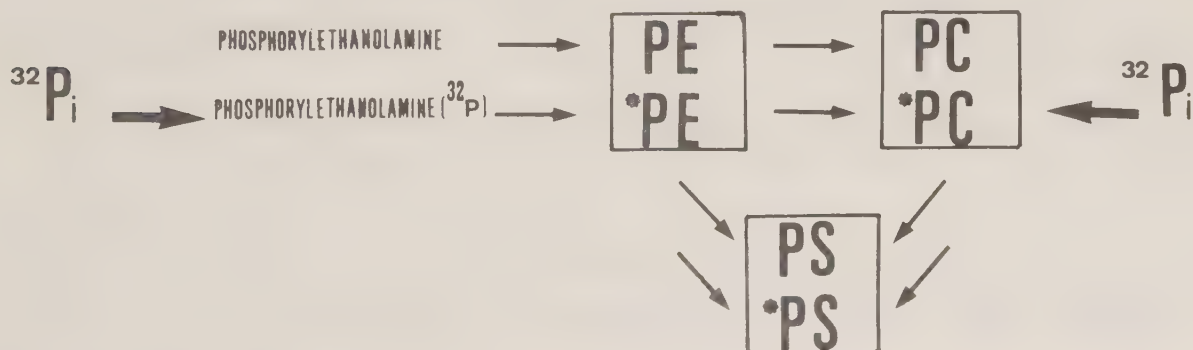


Figure 6 : Schéma explicatif de la dilution isotopique provoquée par la présence de phosphoryléthanolamine dans le milieu d'incubation.

Bien que nous ayons démontré par la suite une faible incorporation *in vitro* de l'acide 2-aminoéthylphosphonique dans les lipides (voir 2ème partie) cette incorporation est négligeable devant celle du phosphate et il ne peut en découler aucune dilution isotopique. Il s'agit donc bien, dans le cas de l'AEP, d'un blocage du processus métabolique. Il n'est d'ailleurs pas exclu que la phosphoryléthanolamine agisse également par un phénomène de blocage dont l'effet s'ajouterait à celui de la dilution isotopique.

II - ACTION DE L'AEP SUR L'INCORPORATION *IN VIVO* DU PHOSPHATE RADIOACTIF DANS LES

LIPIDES

1 - Incorporation *in vivo* de phosphate (^{32}P) dans les lipides de cerveaux et de foies de rats.

MATERIEL ET METHODES

Deux groupes de deux rats albinos Wistar pesant environ 300 g sont utilisés pour cette expérimentation.

Les rats du premier groupe reçoivent une injection intramusculaire de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$ (16 μmoles ; 2 mCi). Pour les rats du second groupe, on ajoute au phosphate radioactif, 10 μmoles d'AEP.

Les animaux restent à jeun pendant la durée de l'expérience et sont tués 24 heures après l'injection. On prélève le cerveau et le foie qui sont lavés par du sérum physiologique à 4°C.

- Extraction lipidique :

Les organes provenant d'un même lot de rats sont traités conjointement. Ils sont découpés en fines lamelles puis broyés à l'ultra-turrax dans 250 ml de méthanol.

Les lipides sont extraits par le mélange chloroforme-méthanol 2/1 selon la méthode de Folch *et coll.* (1).

- Chromatographies :

Les phospholipides sont précipités par l'acétone anhydre à -10°C, puis chromatographiés sur couche mince de silica-gel G dans le solvant : chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60: 30: 6: 1 v/v)

Chaque fraction phospholipidique révélée sur la plaque par les vapeurs d'iode est grattée et éluée par 2 fois 10 ml de chloroforme-méthanol (2:1 v/v).

- Dosage :

Le phosphore est dosé sur une partie aliquote de l'éluat par la méthode de Fiske et Subbarow (2) et la radioactivité déterminée sur une autre partie aliquote par un passeur d'échantillons automatique Tracerlab.

RESULTATS

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux 1 et 2.

TABLEAU 1 : Activité spécifique des phospholipides de cerveaux de rats, 24 heures après une injection intramusculaire de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$.

A : rats témoins ; B : rats traités par l'AEP (10 μmoles).

GROUPE DE RATS	ACTIVITE SPECIFIQUE DES PHOSPHOLIPIDES cpm/ μmole P			
	Ac. Phosphatidiques	Céphalines	Lécithines	Sphingolipides
A	330	480	750	660
B	360	480	810	540

TABLEAU 2 : Activité spécifique des phospholipides de foies de rats, 24 heures après une injection intramusculaire de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$.

A : rats témoins ; B : rats traités par l'AEP (10 μmoles).

GROUPE DE RATS	ACTIVITE SPECIFIQUE DES PHOSPHOLIPIDES cpm/ μmole P				
	Ac. Phosphati.	Céph.	Lécith.	Sphingo.	Lysolécith.
A	5640	1860	1980	1650	1640
B	5940	1880	1930	1630	1710

L'injection d'AEP conjointe avec celle du phosphate (^{32}P) ne provoque que des variations négligeables et non significatives de l'activité spécifique des phospholipides. Nous avons pensé que ces résultats étaient peut-être dus au fait qu'il s'agissait de rats adultes et que la dose d'AEP injecté était trop faible. C'est pourquoi nous avons procédé à une deuxième série d'expérimentations avec des jeunes souris.

2 - Action de l'AEP sur l'incorporation *in vivo* de phosphate (^{32}P) dans les lipides de cerveaux de jeunes souris.

MATERIEL ET METHODES

Des souris Swiss de la même portée, âgées de 7 jours, sont utilisées pour cette expérimentation.

Deux groupes de 2 souris sont constitués. Les souris du premier groupe reçoivent une injection intramusculaire de phosphate de sodium radioactif (0,6 μmole , 7.10^6 cpm) préalablement traité par la méthode de Kennedy (3). Pour les souris du second groupe, 100 μmoles d'AEP sont ajoutées à la solution de phosphate (^{32}P).

Les souris restent à jeun pendant la durée de l'expérience et sont tuées 24 heures après l'injection.

On prélève les cerveaux dont on extrait les lipides selon la méthode de Folch *et coll.* (1).

Les méthodes de chromatographies et de dosages sont décrites dans le paragraphe II-1.

RESULTATS

Le métabolisme *in vivo* des phospholipides n'apparaît que peu affecté par l'injection d'une dose massive d'AEP (100 μ moles pour une souris pesant environ 20 g).

On observe bien une légère diminution de l'activité spécifique des phospholipides (Tableau 3) mais sauf en ce qui concerne les lécithines, cette diminution est trop faible pour être vraiment significative.

TABLEAU 3 : Activité spécifique des phospholipides de cerveaux de jeunes souris, 24 heures après une injection intramusculaire de $\text{HNa}_2^{32}\text{PO}_4$.

A : souris témoins ; B : souris traitées par l'AEP.

	ACTIVITE SPECIFIQUE DES PHOSPHOLIPIDES		
	cpm/ μ mole P	Variation relative %	
	A	B	
Ac. phosphatidiques	1230	1200	- 3
Céphaïnes (PE + PS)	2910	2460	- 6
Lécithines (PC)	4140	3360	- 18
Sphingomyélines	4230	3720	- 12

L'élimination de l'AEP dans les urines n'a pas été contrôlée et a pu être importante. Cette élimination est variable selon le mode d'injection de l'AEP : environ 40% pour une injection intrapéritonéale (4), mais 9% seulement pour une injection intraveineuse (5). Bjerve (6) trouve, après injection intrapéritonéale d'un analogue de la phosphorylcholine, une élimination de 80% de ce composé dans les urines. Nous n'avons aucune donnée en ce qui concerne l'élimination de l'AEP dans les urines après injection intramusculaire.

Il est intéressant de noter qu'une injection de 100 μ moles d'AEP n'a pas provoqué de troubles apparents à une jeune souris de 7 jours dans les 24 heures suivant l'injection : l'AEP serait donc peu -ou pas- toxique pour un organisme de mammifère.

Ces deux séries d'expérimentations -chez le rat adulte et chez la très jeune souris- montrent que l'action de l'acide 2-aminoéthylphosphonique sur le métabolisme *in vivo* des phospholipides ne peut-être comparée à son action *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - J. FOLCH, M. LEES et G.G. SLOANE-STANLEY
J. Biol. Chem., (1957) 226, 497.
- 2 - C.H. FISKE et Y. SUBBAROW
J. Biol. Chem., (1925) 66, 375.
- 3 - E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem., (1953) 201, 399.
- 4 - R. MAGET-DANA, M. TAMARI, J. MARMOUYET et L. DOUSTE-BLAZY
Eur. J. Biochem., (1974) 42, 129.
- 5 - J.M. CURLEY et T.O. HENDERSON
Lipids, (1972) 7, 676.
- 6 - K.S. BJERVE
Biochim. Biophys. Acta, (1972) 270, 348.

CHAPITRE 3

ACTION DE L'ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE SUR LE METABOLISME DE LA PHOSPHATIDYLSERINE ET DE LA PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE

I - DONNEES RECENTES SUR LE METABOLISME DE LA PHOSPHATIDYLSERINE

Les connaissances sur la biosynthèse de la phosphatidylsérine dans les tissus de mammifères se sont développées plus tardivement que pour la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine (1).

En 1957, Kennedy (2) pense que la phosphatidylsérine est biosynthétisée par la même voie que le phosphatidylinositol, c'est à dire par l'intermédiaire de CDP-diglycéride (3) mais un tel processus enzymatique n'a pu être mis en évidence que dans les microorganismes bactériens (4 - 6)

Hübscher *et coll.* (7,8) qui étudient l'incorporation de L-sérine (^{14}C) dans les phospholipides mitochondriaux de foie de rat, indiquent que le CMP et l'ATP sont des activateurs mais non le CTP. D'autre part, ils n'obtiennent pas de dilution isotopique en présence de phosphorylsérine. Ces résultats montrent que la biosynthèse de la phosphatidylsérine n'admet pas le CDP-sérine comme intermédiaire.

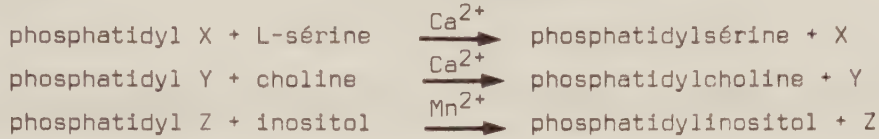
La même équipe (9) est la première à suggérer la possibilité d'un échange de bases avec la phosphatidylcholine : en effet l'incorporation de choline dans les phospholipides est inhibée compétitivement par la L et la D-sérine.

Un tel échange de bases entre phosphatidyléthanolamine et L-sérine est démontré par Borkenhagen *et coll.* (10) dans un homogénat de foie de rat. De plus, le principal phospholipide marqué, après incorporation de L-sérine (^{14}C) est la phosphatidyléthanolamine obtenue après décarboxylation de la phosphatidylsérine préalablement formée. Ce dernier résultat est confirmé par Dirksen *et coll.* (11) dans les cellules osseuses.

La phosphatidylsérine-décarboxylase est localisée dans la fraction mitochondriale du foie de rat (10)

Les mêmes réactions (échange de bases entre phosphatidyléthanolamine et L-sérine et décarboxylation de la phosphatidylsérine) appelées par Kennedy "decarboxylation cycle" (12) ont été mises en évidence chez *Tetrahymena pyriformis* (13).

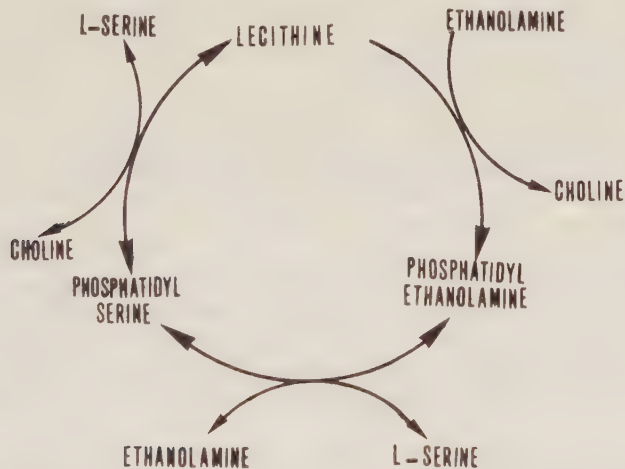
Hübscher (14) reprenant ses travaux sur l'incorporation de L-sérine (^{14}C) indique que cette incorporation est maximale dans la fraction microsomale, qu'elle est activée par Ca^{2+} et qu'elle ne nécessite pas d'énergie. Il propose le mécanisme suivant :



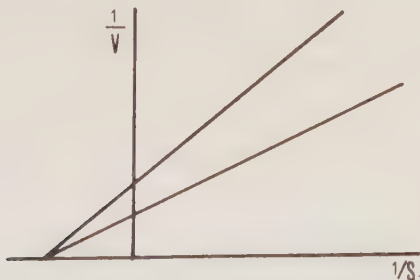
Des réactions d'échanges de bases ont été détectées par Porcellati *et coll.* (15) dans les microsomes de cerveau de poulet, par Miller et Dawson (16) dans le cerveau de cobaye, par Goracci *et coll.* (17), Kanfer (18) et Raghavan *et coll.* (19) dans le cerveau de rat.

Bjerve (20, 21) trouve que l'incorporation de la choline dans les phospholipides microsomaux de foie de rat est inhibée compétitivement par l'éthanolamine et la L-sérine ; celle de la L-sérine est inhibée compétitivement par la choline et l'éthanolamine, alors que l'incorporation de l'éthanolamine est inhibée non compétitivement par la L-sérine et incompétitivement* par la choline.

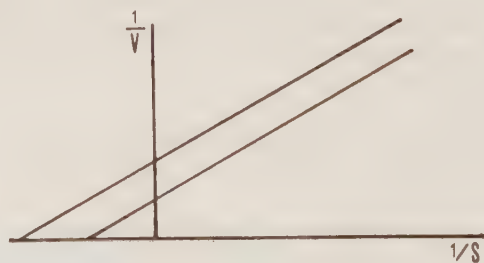
La phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine sont donc des substrats pour l'échange avec la choline, l'éthanolamine et la L-sérine, tandis que la phosphatidyléthanolamine n'échange qu'avec l'éthanolamine et la L-sérine :



* Nous traduisons ainsi le terme anglo-saxon : uncompetitively.



Inhibition non compétitive



Inhibition incompétitive (d'après Bjerve) (20).

Cet échange de bases serait la voie principale pour la biosynthèse de la phosphatidylsérine dans le foie, ce qui n'est pas le cas pour la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine.

Taki *et coll.* (22) pensent qu'en présence d'ions Ca^{2+} , les phospholipides endogènes -sous l'action d'une phospholipase C- sont convertis en acides phosphatidiques, lesquels se combinent ensuite avec les bases libres pour reformer les phospholipides correspondants.

L'incorporation de l'éthanolamine dans une fraction microsomale de cerveau de rat est, en effet, augmentée par l'addition de phospholipase C dans le milieu d'incubation ; cependant l'incorporation de L-sérine ne s'en trouve pas modifiée (18).

Le système enzymatique responsable de l'échange de bases dans le cerveau est concentré surtout dans les membranes entourant le noyau des neurones : Goracci *et coll.* (23) pensent qu'il peut servir de marqueur pour les neurones.

D'après Bjerve (21) une très faible proportion de phospholipides microsomaux participe à l'échange de bases. Les phospholipides nouvellement biosynthétisés sont rapidement transférés de ce "pool" très actif à un "pool" plus important et plus stable de phospholipides microsomaux. Ces deux "pools" sont probablement différenciés par leur localisation intramicrosomale.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - E.P. KENNEDY et S.B. WEISS
J. Biol. Chem. (1956), 222, 193.
- 2 - E.P. KENNEDY
Ann. Rev. Biochem. (1957), 26, 119.
- 3 - B.W. AGRANDOFF, R.M. BRADLEY et R.D. BRADY
J. Biol. Chem. (1958), 233, 1017.
- 4 - J.N. KANFER et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem. (1962), 237, Pc 270.
- 5 - J. KANFER et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem. (1964), 239, 1720.
- 6 - C.R.H. RAETZ et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem. (1972), 247, 2008.
- 7 - G. HÜBSCHER, R.R. DILS et W.F.R. POVER
Nature (1958), 182, 1806.
- 8 - G. HÜBSCHER, R.R. DILS et W.F.R. POVER
Biochim. Biophys. Acta (1959), 36, 518.
- 9 - R.R. DILS et G. HÜBSCHER
Biochim. Biophys. Acta (1961), 46, 505.
- 10- L.F. BORKENHAGEN, E.P. KENNEDY et L. FIELDING
J. Biol. Chem. (1961), 236, Pc 28.
- 11- T.R. DIRKSEN, G.V. MARINETTI et W.A. PECK
Biochim. Biophys. Acta (1970), 202, 80.
- 12- E.P. KENNEDY
The Harvey lectures, series 57, Academic Press Inc., New York (1962) p. 143.

- 13- E.A. DENNIS et E.P. KENNEDY
J. Lipid Res. (1970), 11, 394.
- 14- G. HÜBSCHER
Biochim. Biophys. Acta (1962), 57, 555.
- 15- G. PORCELLATI, G. ARIENTI, M. PIROTTA et D. GIORGINI
J. Neurochem. (1971), 18, 1395.
- 16- E. MILLER et R.M.C. DAWSON
Biochem. J. (1972), 126, 805.
- 17- G. GORACCI, A. GAITI et G. PORCELLATI
The 11th World Congress of the Intern. Soc. for Fat Research, Göteborg
18-22 June, 1972, Abstract n°4.
- 18- J.N. KANFER
J. Lipid Res. (1972), 13, 468.
- 19- S. RAGHAVAN, D. RHOADS et J. KANFER
J. Biol. Chem. (1972), 247, 7153.
- 20- K.S. BJERVE
Biochim. Biophys. Acta (1973), 296, 549.
- 21- K.S. BJERVE
Biochim. Biophys. Acta (1973), 306, 396.
- 22- T. TAKI et M. MATSUMOTO
Jap. J. Exp. Med. (1973), 43, 219.
- 23- G. GORACCI, C. BLOMSTRAND, G. ARIENTI, A. HAMBERGER et G. PORCELLATI
J. Neurochem. (1973), 20, 1167.

II - ACTION DE L'AEP SUR L'INCORPORATION *IN VITRO* DE L-SÉRINE (^{14}C) DANS LES

LIPIDES

Nous avons vu (chapitre 2, p.69) que l'AEP provoquait -selon sa concentration dans le milieu d'incubation- soit une activation de la biosynthèse des phosphatidylsérines, soit, au contraire, une inhibition. Afin de mieux cerner le mécanisme de l'intervention de l'AEP, nous avons étudié son action vis à vis des principales réactions impliquées dans le métabolisme de la phosphatidylsérine (c'est à dire : échange de bases et décarboxylation de PS). Nous n'avons pas étudié l'action de l'AEP sur la dégradation de la phosphatidylsérine par les phospholipases.

L'action de l'AEP sur l'incorporation *in vitro* de la L-sérine (^{14}C) dans les lipides constitue une étude préliminaire.

MATERIEL ET METHODES

- Animaux :

Pour ces expérimentations nous avons utilisé des souris Swiss de 4 jours et des rats albinos Wistar pesant environ 200 g.

- Homogénat de cerveaux de souris :

Les souris sont décapitées et les cerveaux aussitôt prélevés sont homogénéisés au Potter dans 10 volumes (Poids/volume) de saccharose 0,25 M glacé. Les noyaux et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 1000g x 10 min.

- Fraction mitochondriale de foie de rat :

Le rat est sacrifié et son foie aussitôt prélevé est lavé par du sérum physiologique à 4°C. Le foie est découpé en fines lamelles qui sont homogénéisées dans du saccharose 0,25 M à raison de 10ml de saccharose pour 1 g de tissu (homogénat au 1/10ème).

Le fractionnement subcellulaire est réalisé selon la méthode de Vignais et Nachbaur (1) dans une ultracentrifugeuse Martin Christ Omikron. Les noyaux et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 4 500 g x 10 min. et on obtient les mitochondries après centrifugation à 12 500 g x 10 min.. Les mitochondries sont resuspendues dans du saccharose 0,25 M (la fraction mitochondriale correspond à 0,45 g de tissu frais/ml).

- Milieu d'incubation

(D'après Hübscher *et coll.* (2)) : tampon tris HCl (pH 7,4) : 13 mM ; ATP:3,3 mM ; CMP : 3,3 mM ; CaCl_2 : 4 mM ; MgCl_2 : 11,7 mM ; HSCoA : 0,15 mM ; glutathion : 3,3 mM ; L-sérine (^{14}C) uniformément marquée : 5,7 μM , 5 μCi (activité spécifique 59 mCi/mmmole) ; fraction enzymatique : 1 ml d'homogénat de cerveaux de souris (correspondant à 0,1 g de tissu frais) ou 0,75 ml de la fraction mitochondriale de foie de rat (correspondant à 0,35 g de tissu frais).

Le volume total est de 1,6 ml.

La concentration en AEP et la durée de l'incubation sont variables selon les essais.

Les méthodes d'extraction, de chromatographies et de dosages des phospholipides sont décrites dans le chapitre 2 (Parag.: I-1, p. 69).

La fraction "lipides neutres" est rechromatographiée sur couche mince de silica-gel G, solvant : éther de pétrole - éther - acide acétique : 80:20:1 v/v.

Chaque composé, révélé par les vapeurs d'iode est gratté sur la plaque et sa radioactivité totale déterminée par scintillation en milieu liquide (compteur Packard-Tricarb modèle 3320).

RESULTATS ET DISCUSSION

★ Activités spécifiques des différentes classes de phospholipides

- Etude en fonction de la concentration en AEP

L'incorporation *in vitro* de la L-sérine (^{14}C) dans les phospholipides est influencée par la présence d'AEP dans le milieu d'incubation.

Pour de faibles concentrations en AEP ($\leq 5\text{mM}$) on observe une augmentation des activités spécifiques pour tous les phospholipides considérés (Fig. 1). L'activité spécifique de chaque phospholipide diminue régulièrement quand augmente la concentration en AEP.

On peut rapprocher ces observations des résultats concernant le "turnover" de la phosphatidylsérine (^{32}P) en présence d'AEP (Chap. 2, Parag. I, p. 69).

Comme nous avons choisi d'étudier d'abord les phénomènes d'inhibition provoqués par l'AEP, nous expérimentons par la suite avec des concentrations en AEP supérieures à 6 mM.

- Influence de la durée d'incubation sur l'action de l'AEP

Pour une concentration en AEP de 6,65mM on observe un marquage toujours moins important de PE et PC quelle que soit la durée d'incubation (Fig. 2).

Par contre, pour PS, il y a une évolution en fonction du temps : après 90 minutes d'incubation, l'activité spécifique de PS est légèrement augmentée par la présence d'AEP dans le milieu.

Ces divers résultats concernant les activités spécifiques des phospholipides sont difficiles à interpréter. Nous mesurons, en effet, la résultante de plusieurs réactions (Fig. 3) dont les principales sont :

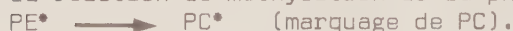
- les deux réactions d'échanges de bases :



- la réaction de décarboxylation de la phosphatidylsérine



- la réaction de méthylation de la phosphatidyléthanoline



- la dégradation des phospholipides par les phospholipases.

Des réactions secondaires comme la formation de sérine-éthanoline-phosphate peuvent aussi avoir lieu (3' - 8). D'autre part, certains auteurs n'ont pas totalement exclu la possibilité de biosynthèse de PS à partir de CDP-diglycéride dans les tissus de mammifères (9).

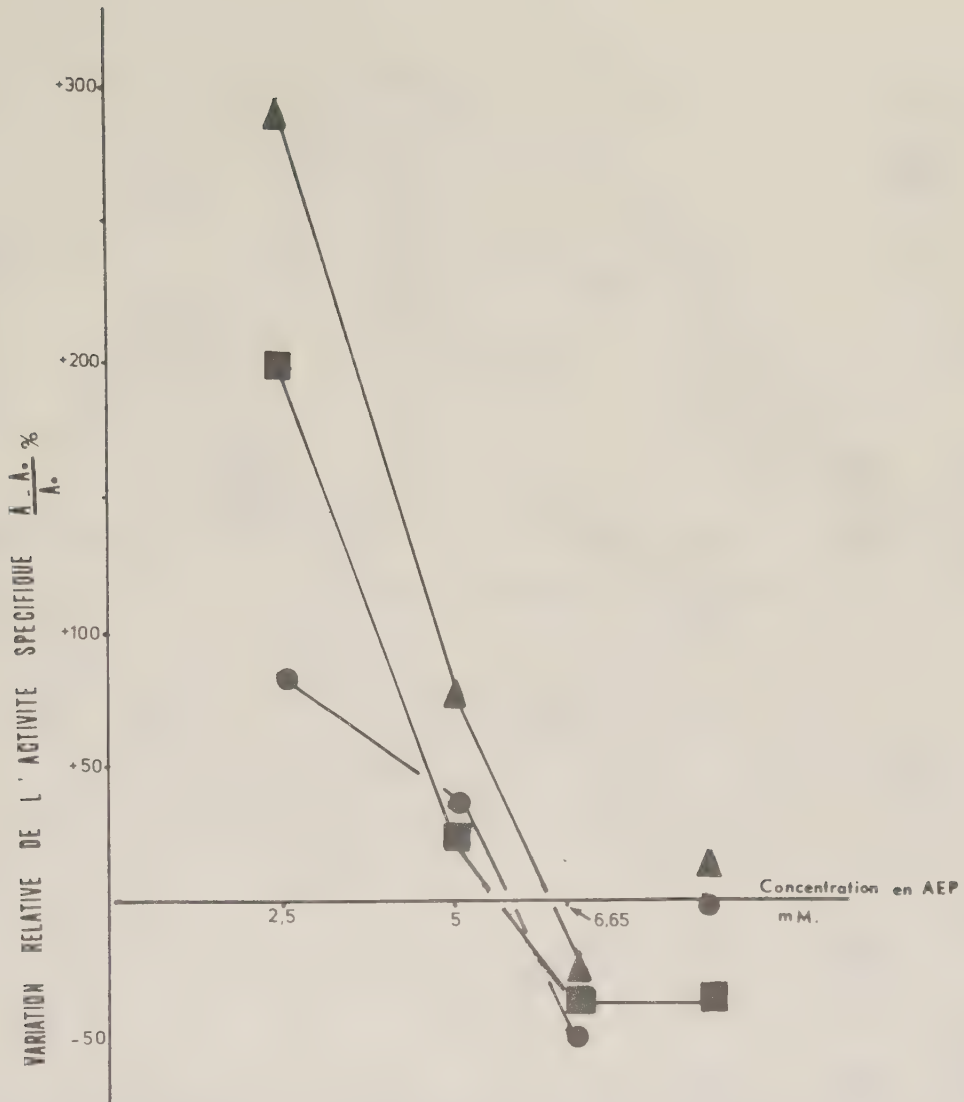


Figure 1 : Action de l'AEP sur les variations relatives des activités spécifiques des phospholipides d'une fraction mitochondriale de foie de rat après incubation avec de la L-sérine (^{14}C).

La durée de l'incubation est de 60 minutes.

$$\frac{\Delta A}{A_0} = \frac{A_x - A_0}{A_0}$$

A_0 = activité spécifique du phospholipide considéré, le milieu d'incubation ne contenant pas d'AEP.

A_x = le milieu d'incubation contient de l'AEP (x mM).

(moyenne de 4 expériences mais une seule valeur pour PC et PS à la concentration de 8,75 mM en AEP).

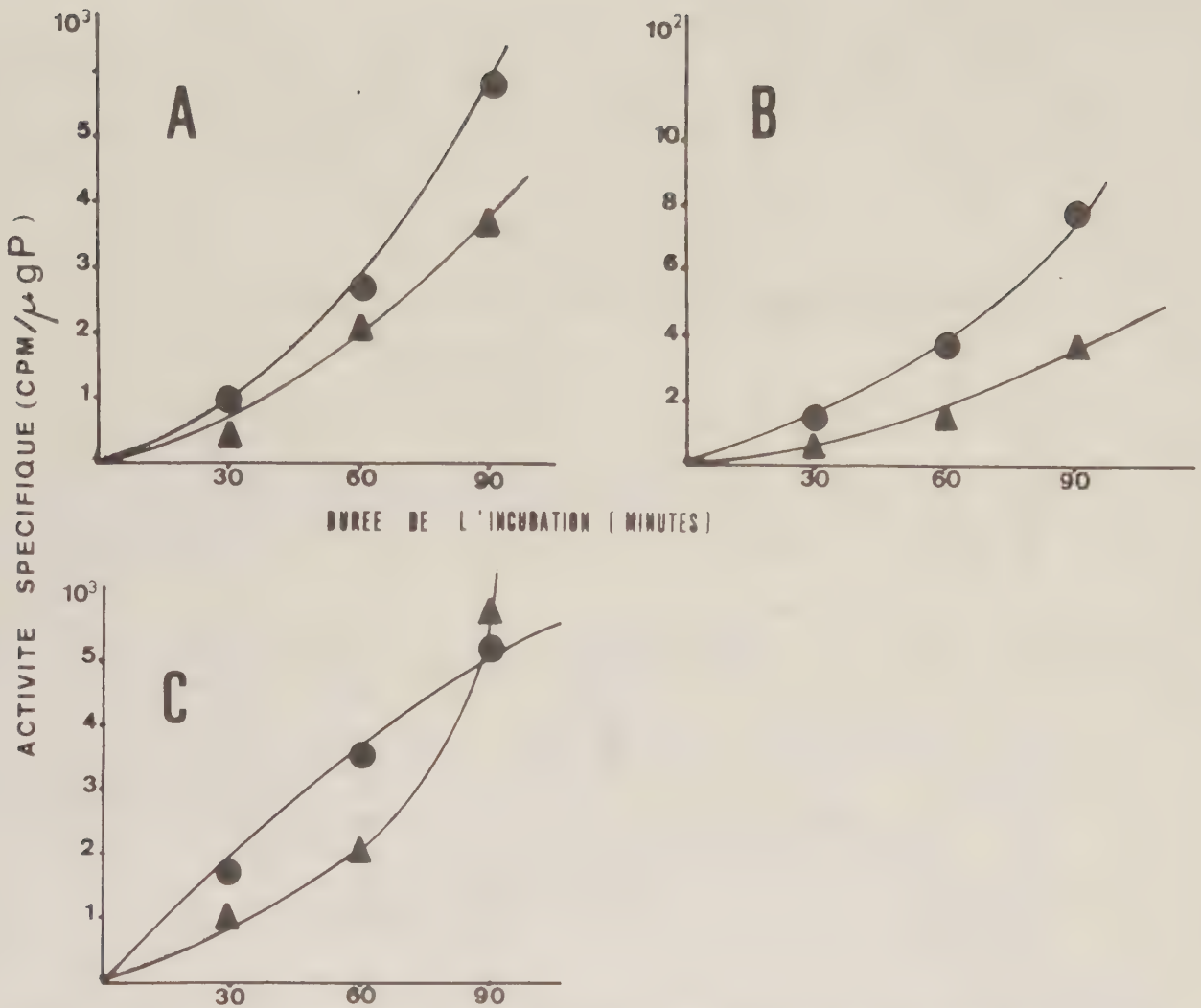


Figure 2 : Influence de l'AEP sur les activités spécifiques des différentes classes de phospholipides d'une fraction mitochondriale de foie de rat après incubation avec L-sérine (^{14}C).

A : Phosphatidyléthanolamines ; B : phosphatidylcholines ; C : phosphatidylsérines.
 -●- Témoin -▲- en présence d'AEP (6,65 mM).

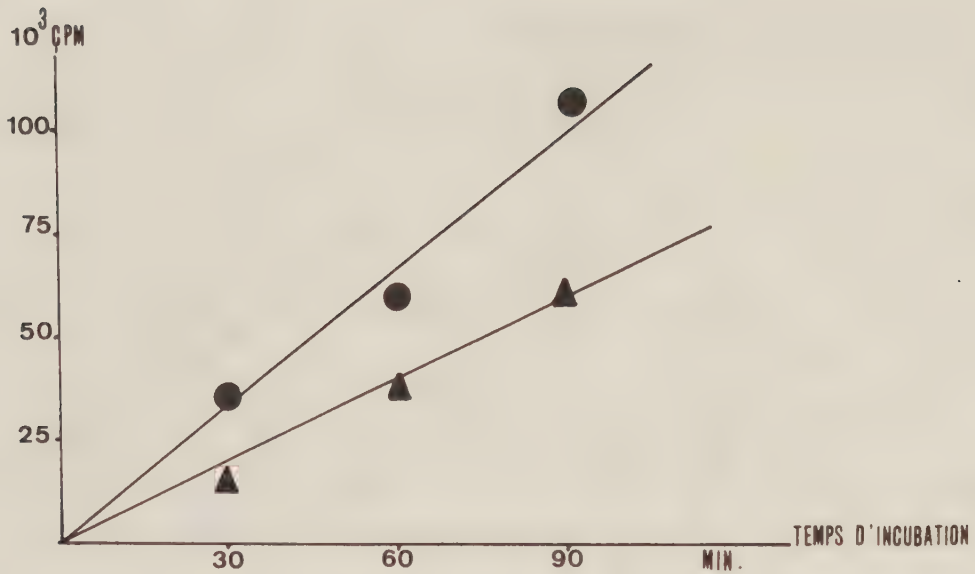


Figure 4 : Action de l'AEP sur l'activité incorporée dans les lipides d'une fraction mitochondriale de foie de rat après incubation avec L-sérine (^{14}C).

● - sans AEP ▲ - en présence d'AEP (6,65 mM).

Mais l'AEP agit-il préférentiellement sur l'échange avec PE ou avec PC, ou encore sur les deux réactions ?.

Nos résultats ne nous permettent pas de répondre à cette question.

Nous étudierons ultérieurement l'action de l'AEP sur l'échange de L-sérine avec PE (Parag. IV, p.104).

★ Pourcentage de l'activité de L-sérine (^{14}C) incorporée, retrouvée dans PS.

TABEAU 1 : Action de l'AEP sur l'incorporation de L-sérine (^{14}C) dans les phospholipides d'un homogénat de cerveaux de jeunes souris.

(La durée de l'incubation est de 60 minutes).

	Activité incorporée dans les phospholipides (cpm)	
	AEP (mM) 0	5
PE	4350	2310
PS	2280	2410
PC	880	600

TABEAU 2 : Action de l'AEP sur l'incorporation de L-sérine (^{14}C) dans les phospholipides d'une fraction mitochondriale de foie de rat.

(La durée de l'incubation est de 90 minutes).

	Activité incorporée dans les phospholipides (cpm)	
	AEP (mM)	0
		6,65
PE	92500	58350
PS	1760	1680
PC	21900	6350

Après incorporation de L-sérine (^{14}C) la majeure partie de l'activité se retrouve dans les phosphatidyléthanolamines. Ce résultat rejoint les observations de Borkenhagen *et coll.* (10) et de Taki et Matsumoto (11).

Après 90 minutes d'incubation d'une fraction mitochondriale de foie de rat avec L-sérine (^{14}C), 80% de l'activité totale incorporée se retrouve dans PE (Tableau 2). La décarboxylation de PS a donc été très importante, ce qui est logique puisque la phosphatidylsérine-décarboxylase est localisée dans les mitochondries (10, 11). Par contre, dans le cerveau, la décarboxylation de PS est plus lente : on ne retrouve que 53 % de l'activité totale incorporée, dans PE (Tableau 1) après 60 minutes d'incubation.

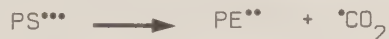
Nous pouvons estimer l'action de l'AEP sur la décarboxylation de PS en comparant les rapports :

$$\frac{\text{Activité de PS}}{\text{Activité totale incorporée}} \quad \text{en l'absence et en présence d'AEP dans}$$

le milieu d'incubation.

Plus ce rapport sera élevé et moins la décarboxylation de PS aura été importante.

Remarque : L-sérine (^{14}C) est marquée uniformément sur les 3 carbones. Pour tenir compte de la décarboxylation de PS, il faut multiplier l'activité déterminée expérimentalement pour PE et PC par 3/2



Le tableau 3 montre que la présence d'AEP dans le milieu d'incubation inhibe la décarboxylation de PS. Nous avons confirmé (12) ce premier résultat comme nous le verrons au paragraphe III (p. 94).

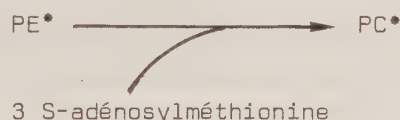
TABLEAU 3 : Pourcentage de l'activité de L-sérine (^{14}C) incorporée, retrouvée dans les phosphatidylsérines.

A : homogénat de cerveaux de souris ; B : fraction mitochondriale de foie de rat.

Expériences	AEP	Activité de PS Activité totale %	
		-	+
A		30,5	45
B		1,5	2,5

★ Influence de l'AEP sur la transformation de PE en PC

Il se forme de la phosphatidylcholine marquée après triméthylation de la phosphatidyléthanolamine (^{14}C) par la S-adénosylméthionine (13, 14).



La sérine est d'ailleurs, pour une grande part, à l'origine du groupe-méthyle de la méthionine (15) par l'intermédiaire du "formaldéhyde actif", le $\text{N}_5\text{-N}_{10}$ -méthylène-tétrahydrofolate (16). Cette réaction est catalysée par la sérine-hydroxyméthylase.

Dans notre expérience, la sérine (^{14}C) étant uniformément marquée fournirait des groupements $-\text{CH}_3$ radioactifs.

La molécule de phosphatidylcholine peut donc être marquée sur les carbones en C_1 et C_2 et aussi sur les carbones des groupements méthyles.

La transformation $\text{PE} \longrightarrow \text{PC}$ peut se mesurer par le rapport

$$\frac{\text{Act PC}}{\text{Act (PE + PC)}}$$

La figure 5 montre que la présence d'AEP dans le milieu d'incubation diminue de 50% la méthylation de la phosphatidyléthanolamine.

Nous n'avons pas encore entrepris l'étude systématique de ce phénomène.

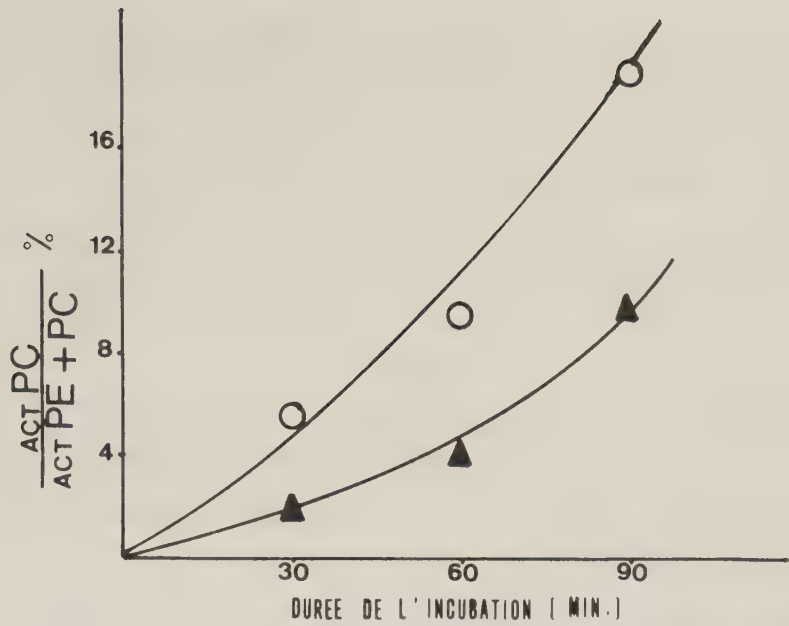


Figure 5 : Action de l'AEP sur la réaction de méthylation de PE en PC, dans une fraction mitochondriale de foie de rat incubée avec de la L-sérine (¹⁴C).

Le milieu d'incubation est décrit dans "Matériel et Méthodes"

-○- sans AEP -▲- en présence d'AEP : 6,65 mM.

★ Action de l'AEP sur l'incorporation de L-sérine (¹⁴C) dans les lipides neutres.

Dirksen *et coll.* (17) ont signalé l'incorporation de L-sérine (¹⁴C) dans les lipides neutres de cellules osseuses. C'est pourquoi nous avons testé cette fraction lipidique.

TABEAU 4 : Action de l'AEP sur l'incorporation de L-sérine (¹⁴C) dans les lipides neutres d'une fraction mitochondriale de foie de rat.

L'incubation a duré 60 minutes à 37°C. Le milieu d'incubation est décrit dans "Matériel et Méthodes".

	ACTIVITE INCORPOREE (cpm)			
	(AEP)10 ⁻³ M	0	2,5	5
Cholestérol		78	122	209
Triglycérides		65	84	112
non identifié		15	21	22
Acides gras libres		75	42	43
Stérides		15	54	52
Activité totale		248	323	438

Il y a donc, en présence d'AEP, une augmentation de l'incorporation de L-sérine (^{14}C) dans les lipides neutres (Tableau 4). Ce résultat est notable surtout pour les stérides mais pour les acides gras libres on observe, au contraire, une diminution de l'activité incorporée.

Nous ne formulerons aucune hypothèse quant aux causes de cette activation.

D'autre part, le faible marquage de cette fraction lipidique ne nous a pas incité à poursuivre cette étude.

CONCLUSIONS

L'incorporation *in vitro* de L-sérine (^{14}C) nous a permis d'entrevoir l'action de l'AEP sur trois réactions impliquées dans le métabolisme des phospholipides.

- l'échange de bases de L-sérine avec les phospholipides endogènes,
- la décarboxylation de PS,
- la méthylation de PE.

Les deux premières réactions seront étudiées d'une façon plus approfondie dans les paragraphes suivants.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - P.M. VIGNAIS et J. NACHBAUR
Bull. Soc. Chim. Biol., (1968) 50, 1473.
- 2 - G. HÜBSCHER, R.R. DILS et W.F.R. POVER
Biochim. Biophys. Acta, (1959) 36, 518.
- 3 - D.D. HAGERMAN, A.H. ENNOR, H. ROSENBERG et S. SUGAI
Fed. Proc. (1963) 22, 294.
- 4 - G. PORCELLATI
Biochim. Biophys. Acta, (1964) 90, 183.
- 5 - G. PORCELLATI, F. DI JESO, M. MALCOVATI et M.G. BIASION
C.R. Soc. Biol., (1965) 159, 1894.
- 6 - G. PORCELLATI, F. DI JESO et M. MALCOVATI
Life Science, (1966) 5, 769.
- 7 - H. ROSENBERG et A.H. ENNOR
Biochim. Biophys. Acta, (1966) 115, 23.
- 8 - A.K. ALLEN et H. ROSENBERG
Biochim. Biophys. Acta, (1968) 151, 504.
- 9 - J.N. KANFER et E.P. KENNEDY
J. Biol. Chem., (1962) 237, Pc 270.
- 10- L.F. BORKENHAGEN, E.P. KENNEDY et L. FIELDING
J. Biol. Chem. (1961) 236, Pc 28.
- 11- T. TAKI et M. MATSUMOTO
Jap. J. Exp. Med., (1973) 43, 219.

- 12- R. MAGET-DANA et L. DOUSTE-BLAZY
Experientia, (1971) 27, 1019.
- 13- J. BREMER et D.M. GREENBERG
Biochim. Biophys. Acta, (1960), 115, 168.
- 14- J. BREMER, P.H. FIGARG et D.M. GREENBERG
Biochim. Biophys. Acta, (1960), 43, 477.
- 15- F.M. HUENNEKENS et M.J. OSBORN
Adv. in Enzymology, (1959) 21, 369.
- 16- B.W. LANGER Jr.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1964) 115, 168.
- 17- T.R. DIRKSEN, G.V. MARINETTI et W.A. PECK
Biochim. Biophys. Acta, (1970) 202, 80.

III - INHIBITION DE LA DECARBOXYLATION *IN VITRO* DE LA PHOSPHATIDYLSERINE PAR L'ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE

Experientia (1971) 27 1019

R. MAGET-DANA et L. DOUSTE- BLAZY

Laboratoire de Biochimie, Centre Anticancéreux, Toulouse

L'acide 2-aminoéthylphosphonique (AEP) a été étudié surtout dans les invertébrés marins et dans les microorganismes (1).

Sa présence dans les lipides cérébraux de boeuf (2) et d'homme (3), et dans les lipides de foie de chèvre (4) suggère un rôle éventuel de ce composé dans le métabolisme des mammifères.

C'est ainsi que l'AEP, ajouté au milieu de biosynthèse des phospholipides en présence de coupes de cerveau et d'orthophosphate ($^{32}\text{P}_i$) n'est pas incorporé sous forme de phosphonolipides*, empêche l'utilisation du $^{32}\text{P}_i$ dans la synthèse des acides phosphatidiques (5) et accélère l'incorporation de $^{32}\text{P}_i$ dans les phosphatidylsérines (6).

Dans le présent travail, nous nous sommes attachés à élucider le mécanisme de l'augmentation de l'activité spécifique des phosphatidylsérines, en étudiant la décarboxylation de la phosphatidylsérine en fonction de la concentration du milieu d'incubation en AEP.

MATERIEL ET METHODES

- Préparation de la fraction mitochondriale

Un rat Wistar (de 200 à 300 g) est sacrifié par section des vertèbres cervicales ; son foie aussitôt prélevé, lavé par du sérum physiologique est découpé en fines lamelles et pesé dans du saccharose 0,25 M glacé, tamponné par du Tris-HCL à pH 7,4.

On effectue un homogénat au Potter dans cette solution de saccharose à raison de 9 ml par gramme de tissu frais. Un volume de cet homogénat est mélangé à un volume égal de saccharose 0,34 M glacé et tamponné à pH 7,4.

On élimine les noyaux et les débris cellulaires par centrifugation à 700 g pendant 10 minutes.

Le surnageant est centrifugé à 5000 g pendant 10 min.

Le culot suspendu dans 5 ml de saccharose 0,25 M est centrifugé à 20 000 g pendant 10 min. Cette opération est effectuée une seconde fois. Le culot en suspension dans du saccharose 0,25 M (entre 2,5 et 5 ml) constitue la fraction mitochondriale.

Toutes les manipulations sont menées entre 0 et + 4°C.

*Depuis la parution de cet article, nous avons mis en évidence une très faible incorporation *in vitro* d'AEP dans un homogénat de foie de rat (voir Deuxième partie, chapitre 2) mais non dans le cerveau.

- Préparation des substrats marqués

Phosphatidylsérine (^{32}P) . Un rat de 250 à 300 g reçoit une injection sous-cutanée d'une solution isotonique d'orthophosphate (^{32}P) disodique (4 mCi) ; le rat est sacrifié 15 heures plus tard et son foie aussitôt prélevé est homogénéisé à l'ultra Turrax. Après extraction et lavage, les lipides sont fractionnés sur colonne d'acide silicique. La fraction $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$: 7:3 par vol. contenant les lécithines et les céphalines est à nouveau chromatographiée sur colonne d'alumine basique(7)

Les céphalines (fraction $\text{CHCl}_3\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH-H}_2\text{O}$ 2:5:2 par vol.) sont ensuite séparées sur couche épaisse (2 mm) de silicagel G ; solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ 25:15:4:2 par vol.

On révèle les composés par autoradiographie. La phosphatidylsérine (^{32}P) est récupérée, éluée par 250 ml de $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 2:1 par vol., concentrée dans 50 ml de chloroforme et stockée à -20°C .

Son activité spécifique est de l'ordre de 3 000 cpm/ μgP .

Phosphatidylsérine (^{14}C) . La phosphatidylsérine (^{14}C) est marquée *in vitro* par incubation d'une fraction mitochondriale de foie de rat avec de la L-sérine (^{14}C) (5 μCi) uniformément marquée (activité spécifique 59 mCi/mme), en présence des cofacteurs suivants (8): tampon Tris pH 7,4 : 10^{-2} M ; tampon phosphate pH 7,4 : $6,25 \cdot 10^{-3}$ M ; α -glycérophosphate : 10^{-3} M ; ATP : $2,5 \cdot 10^{-3}$ M ; CMP: $2,5 \cdot 10^{-3}$ M ; CaCl_2 : $7,5 \cdot 10^{-4}$ M ; MgCl_2 : 10^{-3} M ; CoASH : $6 \cdot 10^{-4}$ M ; glutathion : $2,5 \cdot 10^{-3}$ M. Le volume total est de 4 ml pour une fraction mitochondriale correspondant à 3,4 g de tissu frais.

L'incubation dure 30 min. sous agitation permanente après laquelle les lipides sont extraits, lavés et séparés sur couche mince (700 μ) de silicagel G basique.

Après identification, la phosphatidylsérine (^{14}C) est récupérée et éluée par 100 ml de $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 2:1 par vol. L'éluat est évaporé sous vide et la phosphatidylsérine (^{14}C) est solubilisée dans 20 ml de chloroforme et stockée à -20°C . On détermine son activité spécifique qui est d'environ 900 cpm/ μgP .

- Incubation et comptage du $^{14}\text{CO}_2$.

La solution chloroformique de phosphatidylsérine est évaporée à sec sous azote ; la phosphatidylsérine est ensuite solubilisée dans 0,2 ml de toluène sous forte agitation et incubée dans le milieu suivant (9) : pyridoxal-phosphate $2 \cdot 10^{-3}$ M ; EDTA : $4 \cdot 10^{-3}$ M ; AEP : concentration variable selon les essais (1,8 ; 2,5 ; 5 ; 6,3 et $7,5 \cdot 10^{-3}$ M) ; la fraction mitochondriale correspond à 0,24 g (expériences avec phosphatidylsérine (^{32}P)) ou 0,16 g (phosphatidylsérine (^{14}C)) de tissu frais pour un volume total de 1 ml.

L'incubation dure 60 min. (expériences avec phosphatidylsérine (^{32}P)) et 110 min. (phosphatidylsérine (^{14}C)) sous agitation à 37°C .

Dans le cas d'expérience avec la phosphatidylsérine (^{14}C), le gaz carbonique formé est entraîné par un courant d'azote et fixé par 1 ml d'une solution éthanol-éthanolamine 1:2 par vol. fraîchement préparée (10). L'ensemble du dispositif utilisé est voisin de celui décrit par Baggiolini et Beckel (11).

La réaction est arrêtée par 1 ml de $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 1:2 par vol. et la solution contenant le $^{14}\text{CO}_2$ est comptée dans 15 ml de mélange scintillant (compteur à scintillation Packard-Tricarb).

- Extraction, fractionnement et détermination de l'activité spécifique

des phospholipides

Les lipides sont extraits par quatre fois le mélange (CHCl_3 - CH_3OH 2:1 par vol.)- H_2O 5:1 par vol. La phase chloroformique contenant les lipides est lavée plusieurs fois par la méthode de Folch.

Les lipides sont chromatographiés sur couche mince (500 μ) de silica-gel H basique. Le solvant est le même que celui qui a été utilisé pour la préparation de phosphatidylsérine (^{32}P).

Chaque classe de phospholipides mise en évidence par les vapeurs d'iode est grattée, éluee par 3 fois 10 ml de CHCl_3 - CH_3OH 2:1 par vol.

On détermine l'activité par comptage en scintillation sur une partie aliquote et on dose le phosphore sur une autre partie aliquote par la méthode de Chen (12).

RESULTATS ET DISCUSSION

La décarboxylation de la phosphatidylsérine en présence de mitochondries de foie de rat est étudiée par deux séries d'expériences :

- par détermination de l'activité spécifique de la phosphatidyléthanolamine formée en utilisant un substrat marqué au ^{32}P ;
- par mesure de $^{14}\text{CO}_2$ après incubation de substrat marqué au ^{14}C .

1 - Activité spécifique de la phosphatidyléthanolamine (^{32}P) formée

L'activité spécifique de la phosphatidylsérine (^{32}P) mise en réaction est 2760 cpm/ μgP , compte tenu de la phosphatidylsérine propre à la fraction mitochondriale et déterminée sur une partie aliquote de la préparation mitochondriale.

Les résultats de nos essais sont consignés dans le tableau 1.

TABEAU 1 : Incubation de mitochondries de foie de rat en présence de 0,8 μM de phosphatidylsérine (^{32}P) et de 1,8 et 6,35 $\mu\text{M}/\text{ml}$ d'acide 2-aminoéthylphosphonique (AEP)

Activité spécifique (exprimée en cpm/ μgP .)			
Concentration en AEP	0	$1,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$6,35 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
Phosphatidyléthanolamine	1785	1660	1400
Phosphatidylcholine	95	80	74

Il ressort de l'examen de nos résultats que les teneurs en phosphatidyléthanolamine (^{32}P) et en phosphatidylcholine (^{32}P) des milieux d'incubation diminuent en présence d'AEP. Il n'est pas surprenant que l'action de l'AEP s'exerce à la fois sur la biosynthèse de la phosphatidyléthanolamine et sur celle de la phosphatidylcholine, puisqu'au cours de la synthèse des lécithines, la méthylation affecte la molécule de phosphatidyléthanolamine.

Le calcul des variations relatives des activités spécifiques (fig. 1) fait apparaître une diminution de phosphatidyléthanolamine (^{32}P) formée respectivement de 7 % et de 21 % en présence de 1,8 mM et de 6,3 mM d'AEP. L'apparition de phosphatidylcholine (^{32}P) varie dans le même sens : diminution de 14 % et 21 %.

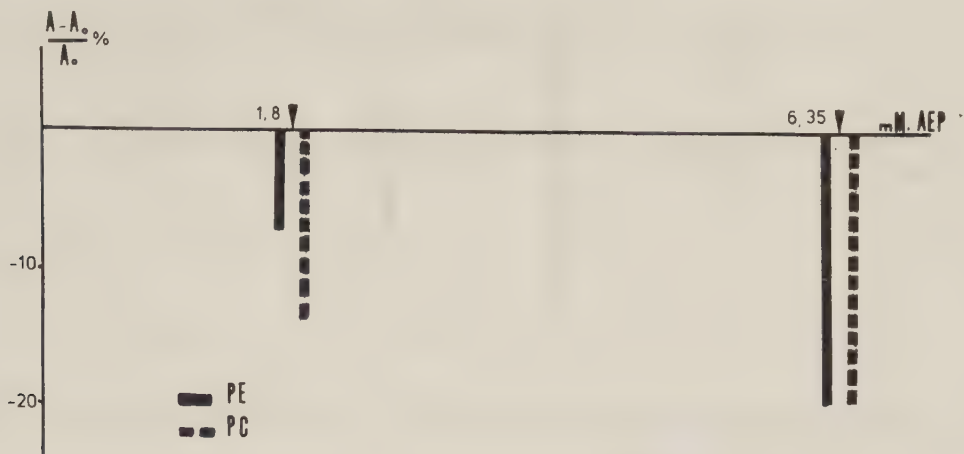


FIGURE 1 : Variations relatives des activités spécifiques de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylcholine, en fonction de la concentration en AEP.

2 - Mesure de la radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$ formé

L'activité spécifique de la phosphatidylsérine (^{14}C) ($10,4 \mu\text{M}$) mise en réaction est $27600 \text{ cpm}/\mu\text{M}$. Nous avons fait 4 essais dont les concentrations en AEP sont les suivantes : 0 - $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ - $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ - $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Les chiffres consignés dans le tableau 2 rapportent l'activité totale du gaz carbonique au cours de l'incubation.

TABEAU 2 : Décarboxylation de la phosphatidylsérine (^{14}C). Activité du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé exprimée en cpm.

(AEP)	0	$2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$7,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
$^{14}\text{CO}_2$	170	129	96	115

Le calcul des variations relatives des formations de $^{14}\text{CO}_2$ (fig. 2) montre une importante diminution de la décarboxylation en présence d'AEP. Le phénomène atteint un maximum (abaissement de 43 %) pour une concentration de 5 mM d'AEP dans le milieu d'incubation. A une concentration plus forte ($7,5 \text{ mM}$ d'AEP) la décarboxylation est diminuée de 32 %.



FIGURE 2 : Variations relatives de l'activité du $^{14}\text{CO}_2$ formé en fonction de la concentration en AEP.

Nos résultats montrent l'inhibition par l'AEP de la réaction de décarboxylation de la phosphatidylsérine en phosphatidyléthanolamine :



Ils confirment les travaux concernant l'effet de ce composé sur la biosynthèse des phospholipides cérébraux (6) : des incubations d'orthophosphate (^{32}P) en présence de coupes de cerveaux de souris et d'AEP aboutissaient pour des concentrations en AEP inférieures à $5 \cdot 10^{-3}$ M à une accumulation de phosphatidylsérine (^{32}P) et à une diminution des autres phosphoaminolipides. Dans l'état actuel de ce travail, il n'est pas possible de préciser le mécanisme de l'inhibition exercée par l'AEP. On peut cependant rapprocher ces phénomènes de l'effet inhibiteur exercé par des phosphonolipides synthétiques sur les phospholipases A (13) et C (14) et qui démontre l'intervention de ces composés dans le métabolisme des phospholipides.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - J.S. KITTREDGE et S.E. ROBERT
Science 164, 37, (1969).
- 2 - H. SHIMIZU, Y. KAKIMOTO, T. NAKAJIMA, A. KANAZAWA et T. SANO
Nature, Lond. 207, 1197, (1965).
- 3 - J.A. ALHADEFF et G.D. DAVES Jr.
Biochemistry 9, 4866, (1970)
- 4 - M. KANDATSU et M. HORIGUCHI
Agric. Biol. Chem. 29, 781, (1965)
- 5 - R. DANA et L. DOUSTE-BLAZY
C. R. Acad. Sci., Paris 268, 185, (1969)
- 6 - R. DANA et L. DOUSTE-BLAZY
Bull. Soc. Chim. Biol. 52, 405, (1970)
- 7 - J. LLOVERAS et L. DOUSTE-BLAZY
Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 157, (1968)

- 8 - V.P. SKIPSKY, R.F. PETERSON et M. BARCLAY
Biochem. J. 80, 374, (1964)
- 9 - C. HUBSCHER, R.R. DILS et W.F.R. POVER
Biochim. Biophys. Acta 36, 518, (1959)
- 10- L.F. BORKENHAGEN, E.P. KENNEDY et L. FIELDING
J. Biol. Chem. 236, PC 28, (1961)
- 11- C.H. WANG
in Methods of Biochemical Analysis (Ed. D. Glick ; Interscience, New York 1967)
15, p. 311
- 12- M. BAGGIOLINI et M. H. BICKEL
Analyt. Biochem. 14, 290, (1966)
- 13- M. PAYSANT, R. WALD et J. POLONOVSKI
Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 621, (1965)
- 14- P.S. CHEN Jr., T.Y. TORIBA et H. WARNER
Analyt. Chem. 28, 1756, (1956)
- 15- A.F. ROSENTHAL et S. CHING-HISIEN HAN
Biochim. Biophys. Acta 218, 213, (1970)
- 16- A.F. ROSENTHAL et M. POUSADA
Biochim. Biophys. Acta 164, 226, (1968)

IV - ACTION DE L'AEP SUR L'ECHANGE DE BASES ENTRE LA PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE ET LA

L-SERINE

Notre étude préliminaire sur l'incorporation *in vitro* de L-sérine (^{14}C) (Parag. II, p. 87) a montré la probabilité d'une action de l'AEP sur l'échange de bases entre les phospholipides PE et PC et la L-sérine.

Le travail présenté dans ce paragraphe concerne uniquement l'échange de la L-sérine avec la phosphatidyléthanoline.



MATERIEL ET METHODES

Préparation de la phosphatidyléthanoline (^{14}C)

Nous avons préparé enzymatiquement PE (^{14}C) à partir d'éthanolamine uniformément marquée (30 mCi/ mmole).

Le milieu d'incubation est le suivant : tampon phosphate (pH 7,4) 0,1mM ; ATP 1,5 mM ; CTP 0,1 mM ; éthanolamine (U- ^{14}C) : 50 μCi (1,67 μmole) ; homogénat de foie de rat au 1/10ème : 10 ml.

L'incubation dure 1h30 à 37°C.

La réaction est bloquée par 10 ml de chloroforme-méthanol 2:1.

Les lipides sont extraits comme il a été indiqué précédemment (Parag. I, p. 69).

La phosphatidyléthanoline (^{14}C) est séparée des autres phospholipides par chromatographie sur couche épaisse (2 mm) de silica-gel G (plaque préparative Merck) ; solvant : chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (75:45:12:6 v/v/v/v).

Après autoradiographie de la plaque (durée de contact avec le film : 1 heure), la phosphatidyléthanoline (^{14}C) -qui est le seul phospholipide marqué visible sur l'autoradiogramme- est grattée et éluée en chambre froide par 100 ml de chloroforme-méthanol 2:1 v/v.

L'éluat est évaporé à sec et la phosphatidyléthanoline (^{14}C) solubilisée dans 10 ml de chloroforme.

On détermine la radioactivité spécifique (voir méthodes parag. III, p. 98) de PE (^{14}C) qui varie -selon les expériences- entre 57 000 et 120000 dpm/ μmole .

- Fraction microsomale de foie de rat :

Un rat albinos Wistar pesant environ 200g est sacrifié et son foie homogénéisé au Potter dans du saccharose 0,25 M tamponné à pH 7,4 par du Tris-HCl (homogénat au 1/10ème). On effectue un fractionnement subcellulaire de l'homogénat dans une ultracentrifugeuse Spinco (modèle L3-50). Les microsomes sédimentent à 105000 g x 60 min. (1). Ils sont resuspendus dans du saccharose 0,25 M.

- Milieu d'incubation :

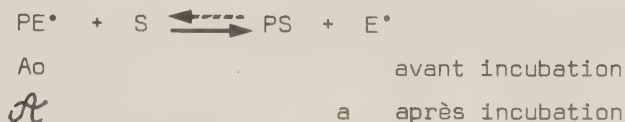
(D'après Borkenhagen *et coll.* (2)) tampon phosphate (pH 7,4) : 2,4 mM ; CaCl_2 : 4,5 mM ; diacylglycérophosphoryl (U- ^{14}C) éthanola mine* : 1,4 mM ; L-sérine : de 0 à 5 mM selon les essais ; AEP ajouté selon les essais ; 1 ml de la fraction microsomale pour un volume final de 1,5 ml.

La durée de l'incubation est de 30 ou 60 minutes à 37°C.

L'extraction lipidique et la séparation de PE des autres phospholipides ont été indiquées dans "préparation de phosphatidyléthanola mine (^{14}C)" (p.104).

On gratte la tâche correspondant à PE (^{14}C) qui est comptée en totalité dans un compteur à scintillation Packard-Tricarb (modèle 3 320).

RESULTATS ET DISCUSSION



Nous appelons Ao l'activité totale (en dpm) de la phosphatidyléthanola mine (^{14}C) mise en réaction.

Pendant l'incubation, il y a échange entre l'éthanolamine (^{14}C) de PE (^{14}C) et la L-sérine. L'activité totale de la fraction phosphatidyléthanola mine a donc diminué : elle est devenue $\mathcal{A}$ qui est mesurée expérimentalement.

L'activité -en dpm- de l'éthanolamine (^{14}C) échangée est $\text{Ao} - \mathcal{A} = a$.

En fait, pour tenir compte des conditions expérimentales et ne mesurer que la perte d'activité de la fraction PE résultant de l'échange de bases, nous faisons deux témoins (sans L-sérine) avec et sans AEP.

En fin d'incubation, l'activité totale des PE pour ces témoins est $\mathcal{A}_0$ (sans AEP) et $\mathcal{A}'_0$ (avec AEP) et nous calculons $\mathcal{A}_0 - \mathcal{A}$ ou $\mathcal{A}'_0 - \mathcal{A}$ (selon que l'essai considéré contient ou non de l'AEP).

Connaissant l'activité spécifique de PE (^{14}C) , on détermine le nombre de moles d'éthanolamine (^{14}C) échangées.

Nous avons construit les courbes selon Lineweaver - Burk (3).

La Figure 1 montre que les résultats obtenus varient avec les conditions expérimentales.

Comparons les graphiques 1A et 1C où le K_m apparent est identique (2,5mM) nous voyons que pour de faibles concentrations en L-sérine (inférieures à 1mM), l'AEP (à la concentration de 2mM ou de 6,55 mM) n'a pas d'action sur l'échange de bases entre PE et L-sérine.

* La phosphatidyléthanola mine (^{14}C) a été émulsionnée dans le tampon par ultrasonation pendant 1 minute dans un bain de glace (ultrasonneur 20 Kcycles M.S.E.).

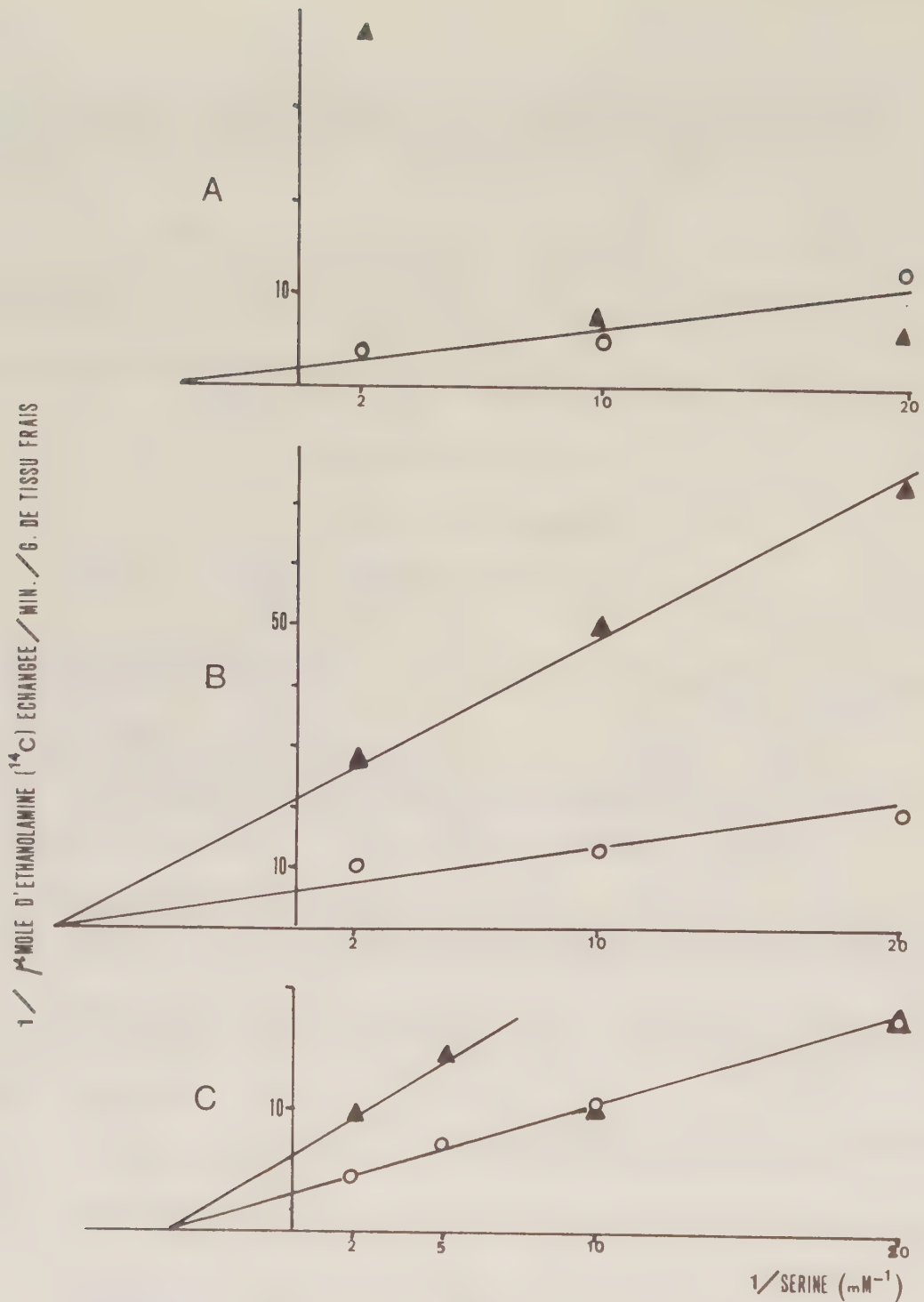


Figure 1 : Echange de bases entre phosphatidyléthanola mine (^{14}C) et L-sérine.
Inhibition par l'AEP.

- A : concentration en AEP : 2 mM ; durée de l'incubation : 60 min. ; la fraction microsomale correspond à 0,8 g de tissu frais.
 B : concentration en AEP : 4 mM ; durée de l'incubation : 60 min. ; la fraction microsomale correspond à 1,2 g de tissu frais.
 C : concentration en AEP : 6,55 mM ; durée de l'incubation : 30 min. ; la fraction microsomale correspond à 0,4 g de tissu frais.

-○- témoin -▲- en présence d'AEP.

On peut penser que -à ces concentrations- toute la L-sérine mise en réaction est échangée avec la PE (^{14}C) et la PC endogène de la fraction microsomale: l'AEP n'interviendrait donc pas.

Par contre, à des concentrations plus importantes en L-sérine, il y aurait inhibition non compétitive de l'échange de bases par l'AEP (à la concentration de 6,55 mM).

Cependant, pour l'expérience représentée graphiquement sur la figure 1B, le K_m apparent est de l'ordre de 1,2 mM et l'AEP (à la concentration de 4 mM) se comporte alors comme un inhibiteur non compétitif de l'échange de bases quelle que soit la quantité de L-sérine dans le milieu d'incubation.

Tout se passe comme si le fait d'améliorer les conditions expérimentales requises pour l'échange de bases (ce qui revient à diminuer la valeur du K_m apparent) augmentait, du même coup, le pouvoir inhibiteur de l'AEP.

Cette étude est incomplète, car nous devons connaître avec précision lesquels de ces facteurs sont déterminants pour l'action de l'AEP :

- la valeur du K_m apparent,
- la concentration en L-sérine dans le milieu d'incubation,
- la concentration en AEP dans le milieu d'incubation.

De plus, il nous faudra étudier l'action de l'AEP sur l'échange de bases entre phosphatidylcholine et L-sérine.

Nous pouvons dire cependant que, dans des conditions expérimentales particulières, l'AEP se comporte comme un inhibiteur non compétitif de l'échange de bases entre phosphatidyléthanolamine et L-sérine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - P.M. VIGNAIS et J. NACHBAUR
Bull. Soc. Chim. Biol., (1968) 50, 1473.
- 2 - L.F. BORKENHAGEN, E.P. KENNEDY et L. FIELDING
J. Biol. Chem., (1961) 236, P.C. 28.
- 3 - H. LINEWEAVER et D. BURK
J. Am. Chem. Soc., (1934) 56, 658.

V - ACTION DE L'AEP SUR LE METABOLISME DE LA PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE

1 - Incorporation d'éthanolamine (^{14}C) dans les lipides

Nous avons étudié l'incorporation d'éthanolamine (^{14}C) dans les lipides d'un homogénat de foie de rat en présence d'AEP.

METHODE EXPERIMENTALE

L'homogénat de foie de rat est préparé comme il a été indiqué page 32.

Le milieu d'incubation comprend : tampon phosphate (pH 7,4) 25 mM ; CaCl_2 5 mM ; ATP 5 mM ; éthanolamine (^{14}C) (30 mCi/mmol) 0,1 mM. L'AEP est ajouté aux concentrations 0, 2, 4 et 6 mM. Le volume total est 1,5 ml pour 1 ml d'homogénat dilué 10 fois.

L'incubation dure 1 heure à 37°C et est arrêtée par 0,5 ml de chloroforme-méthanol (1:2 v/v).

Les lipides sont extraits par la méthode habituelle (p. 70) et lavés par la solution chloroforme-méthanol-eau (3:47:48 v/v/v).

Une partie aliquote de l'extrait lipidique est comptée par scintillation en milieu liquide.

RESULTATS ET DISCUSSION

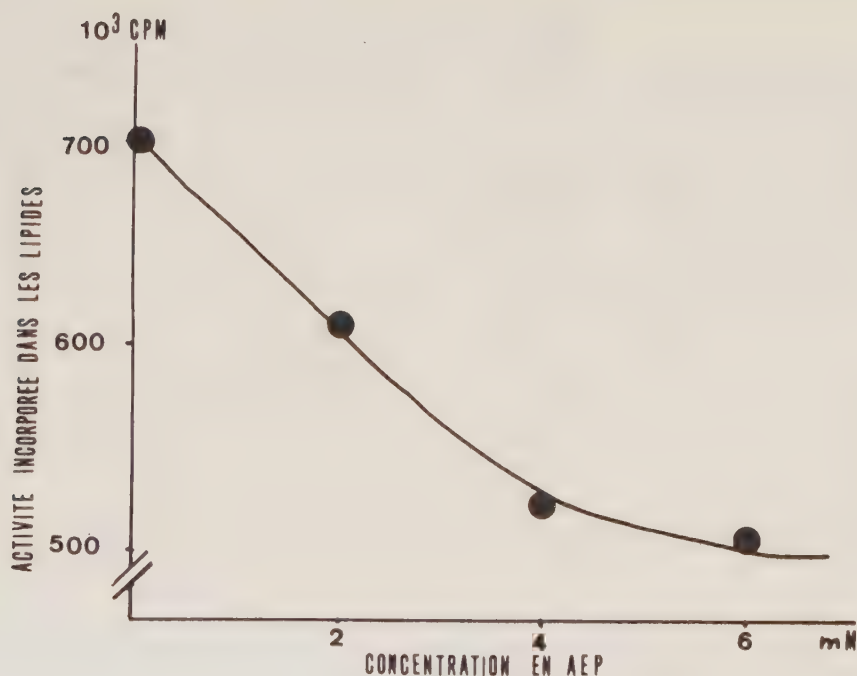
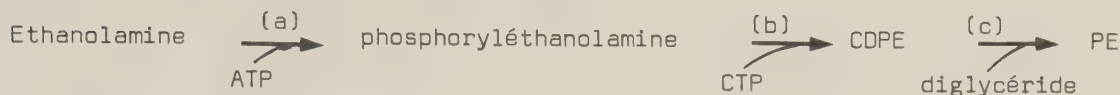


Figure 1 : Influence de la concentration en 2-AEP sur l'incorporation d'éthanolamine (^{14}C) dans les lipides d'un homogénat de foie de rat.

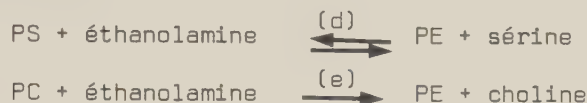
Comme le montre la Figure 1, l'incorporation de l'éthanolamine (^{14}C) dans les lipides diminue en fonction de la concentration en 2-AEP dans le milieu d'incubation.

L'éthanolamine s'incorpore dans les lipides par les deux voies suivantes

1) - phosphorylation



2) - Echange de bases entre phospholipides



La première voie est favorisée par la présence d'ATP dans le milieu d'incubation, la seconde par les ions Ca^{2+} . Nous mesurons un effet global : nous savons déjà (paragraphe précédent) que 2-AEP est un inhibiteur pour la réaction (d) tout au moins dans le sens de la formation PS. Nous allons voir que 2-AEP se comporte également comme un inhibiteur pour la réaction (b).

2 - Inhibition de la phosphoryléthanolamine-cytidylyltransférase de foie de rat par les acides 1 et 2-aminoéthylphosphoniques

En collaboration avec Monique PLANTAVID

Nous avons vu que l'acide 2-aminoéthylphosphonique est un inhibiteur de la biosynthèse *in vitro* des phospholipides et que son action s'exerce à diverses étapes de cette biosynthèse (1, 2) et pour différents précurseurs : phosphate (^{32}P) (1), sérine (^{14}C) et éthanolamine (^{14}C). D'autre part, 2-AEP est un substrat pour la phosphoryléthanolamine-cytidylyltransférase de foie de rat (p.51). C'est pourquoi nous avons étudié l'inhibition de la phosphoryléthanolamine-cytidylyltransférase par l'acide 2-aminoéthylphosphonique. Nous avons également comparé les actions des isomères 1 et 2-AEP.

MATERIEL ET METHODES

- Fraction enzymatique

La préparation de la fraction enzymatique:phosphoryléthanolamine-cytidylyltransférase a été décrite précédemment (p.51).

- Substrats radioactifs

2-AEP (^{32}P) est préparé comme il a été décrit précédemment (p. 32).

La phosphoryléthanolamine (^{14}C) est préparée enzymatiquement par la méthode de Schneider *et coll.* (3) par incubation d'éthanolamine (^{14}C) avec du surnageant post-microsomal de foie de rat. Le produit obtenu est séparé de l'éthanolamine (^{14}C) par chromatographie sur colonne (2,5 x 60 cm) de résine Dowex-1- X_2 (100-200 mesh) forme formiate (4).



Figure 1 : (Non mentionnée dans le texte) : Autoradiogramme montrant la séparation chromatographique de phosphoryléthanolamine (^{14}C) et CDP-éthanolamine (^{14}C) formé après incubation.

Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

La tache inférieure correspond à la phosphoryléthanolamine (^{14}C), la tache supérieure au CDP-éthanolamine (^{14}C) formé.

C : concentration initiale en phosphoryléthanolamine (^{14}C) dans le milieu d'incubation (0,9 mM).

(Durée de contact du film : 8 jours).

- Essai enzymatique

Les protéines enzymatiques (6mg) sont mises à incuber pendant 15 min. à 37°C avec de la phosphoryléthanolamine (^{14}C) (950 000 dpm/ μmole) en présence des effecteurs suivants : CTP : 4 mM ; MgCl_2 : 10 mM ; tampon tris-acide succinique (pH 6) : 20 mM. L'inhibition par 2-AEP est étudiée aux concentrations de 5, 10 et 15 mM et l'inhibition par 1-AEP à la concentration de 15 mM. Le volume total est de 0,5 ml.

La réaction est arrêtée par dénaturation thermique de l'enzyme. Les protéines sont éliminées par centrifugation. Une partie aliquote du surnageant (50 à 100 μl) est prélevée et chromatographiée sur couche mince (0,2 mm) de silica-gel G (plaque Merck) dans le solvant acide acétique 0,02M dans de l'éthanol à 80% (5) (témoins CDP-éthanolamine et phosphoryléthanolamine).

Le CDP-éthanolamine (^{14}C) formé et la phosphoryléthanolamine (^{14}C) résiduelle sont détectés par autoradiographie (films Kodirex). Les aires correspondant aux taches radioactives sont grattées sur la plaque et comptées par scintillation en milieu liquide (compteur Packard-Tricarb modèle 3 390).

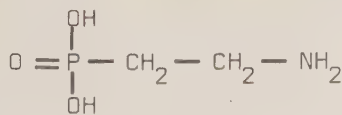
On détermine ainsi le taux de formation de CDP-éthanolamine (^{14}C) à partir de phosphoryléthanolamine (^{14}C).

RESULTATS ET DISCUSSION

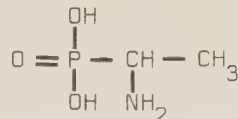
La figure 2 montre que l'acide 2-aminoéthylphosphonique se comporte comme un inhibiteur compétitif de la phosphoryléthanolamine pour la formation de CDP-éthanolamine.

Le K_m de l'enzyme pour la phosphoryléthanolamine est 1,6 mM (moyenne de cinq expérimentations). D'après les courbes de Lineweaver-Burk on détermine la valeur de la constante apparente d'inhibition par 2-AEP : $K_i = 28,5$ mM. Elle est du même ordre de grandeur que le K_m de l'enzyme quand 2-AEP est utilisé comme substrat ($K_m = 36$ mM).

Nous avons comparé l'action de l'acide 2-aminoéthylphosphonique -qui est l'analogue structural de la phosphoryléthanolamine- à celle de son isomère : l'acide 1-aminoéthylphosphonique.



2-AEP



1-AEP

La figure 3 montre que l'acide 1-aminoéthylphosphonique se comporte comme un inhibiteur non compétitif de la PE cytidyltransférase. Sa constante apparente d'inhibition est égale à 22,5 mM.

La nature compétitive de l'inhibition de la PE-cytidyltransférase par 2-AEP suggère que cette inhibition résulte d'une interférence avec la formation du complexe enzyme-phosphoryléthanolamine : 2-AEP se fixerait sur le même site enzymatique que la phosphoryléthanolamine pour former CMP-AEP ; 1-AEP se fixerait, lui, sur un autre site enzymatique, modifiant la structure quaternaire de l'enzyme.

Figure 2 : Courbe de Lineweaver-Burk montrant l'inhibition compétitive de la PE-cytidylyltransférase par 2-AEP.

- : incorporation de la phosphoryléthanolamine (^{14}C) en CDP-éthanolamine (^{14}C),
- : inhibition par 2-AEP (5 mM),
- ▲- : inhibition par 2-AEP (10 mM).

V exprimé en nmoles de CDPE formées/min./mg de protéines
S (en mM) est la concentration en phosphoryléthanolamine (^{14}C) dans le milieu d'incubation.

Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte.

---□--- : incorporation de 2-AEP (^{32}P) en CMP-AEP (^{32}P).

Dans ce cas V s'exprime en nmoles de CMP-AEP formées/min./mg de protéines et S (en mM) est la concentration en 2-AEP (^{32}P) dans le milieu d'incubation. 2-AEP (^{32}P) (152 000 dpm/ μmole) est préparé à partir d'une culture de *Tetrahymena pyriformis* (voir page 32).

Les conditions d'incubation sont les mêmes que pour la phosphoryléthanolamine (^{14}C).

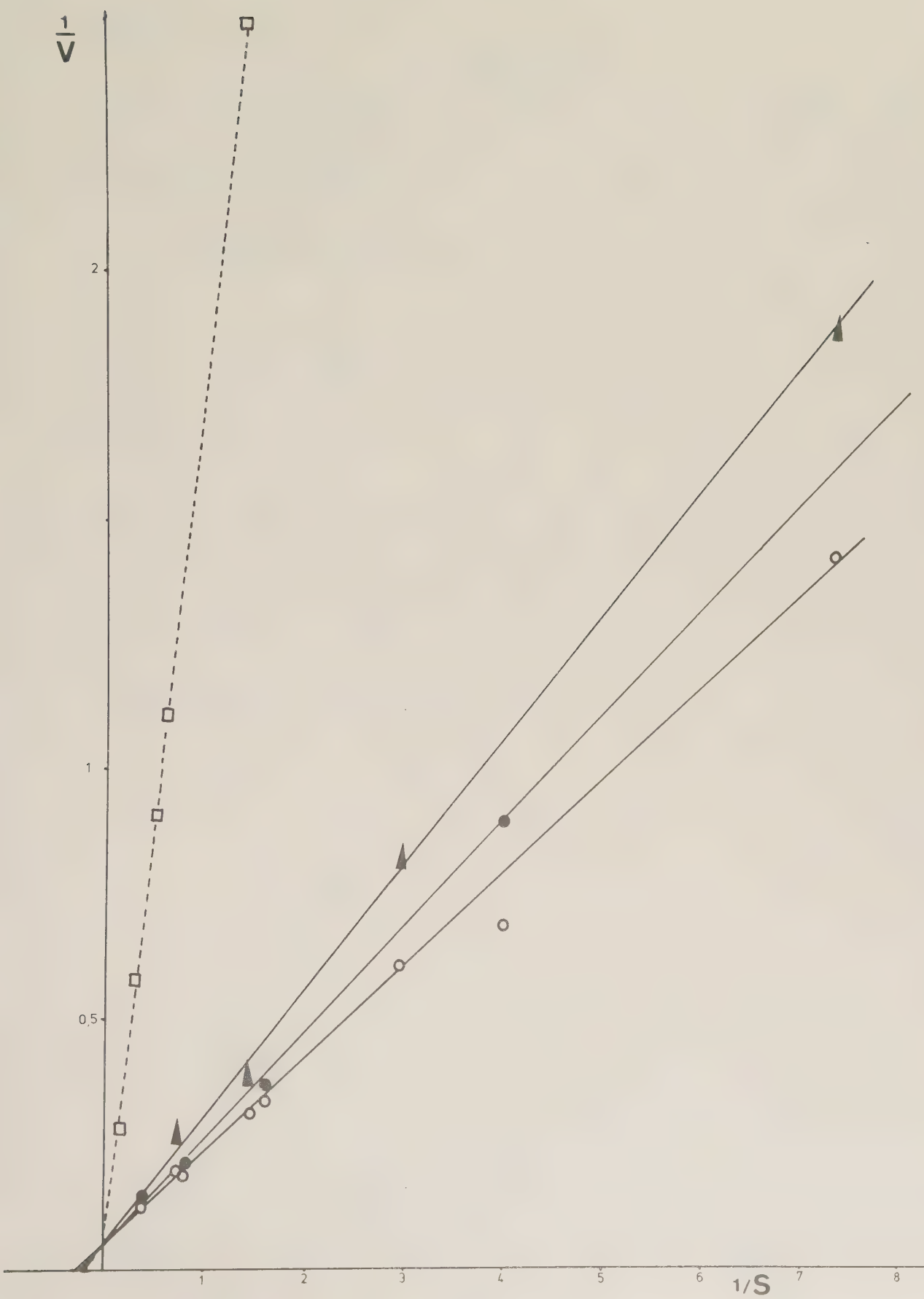
ci-contre →

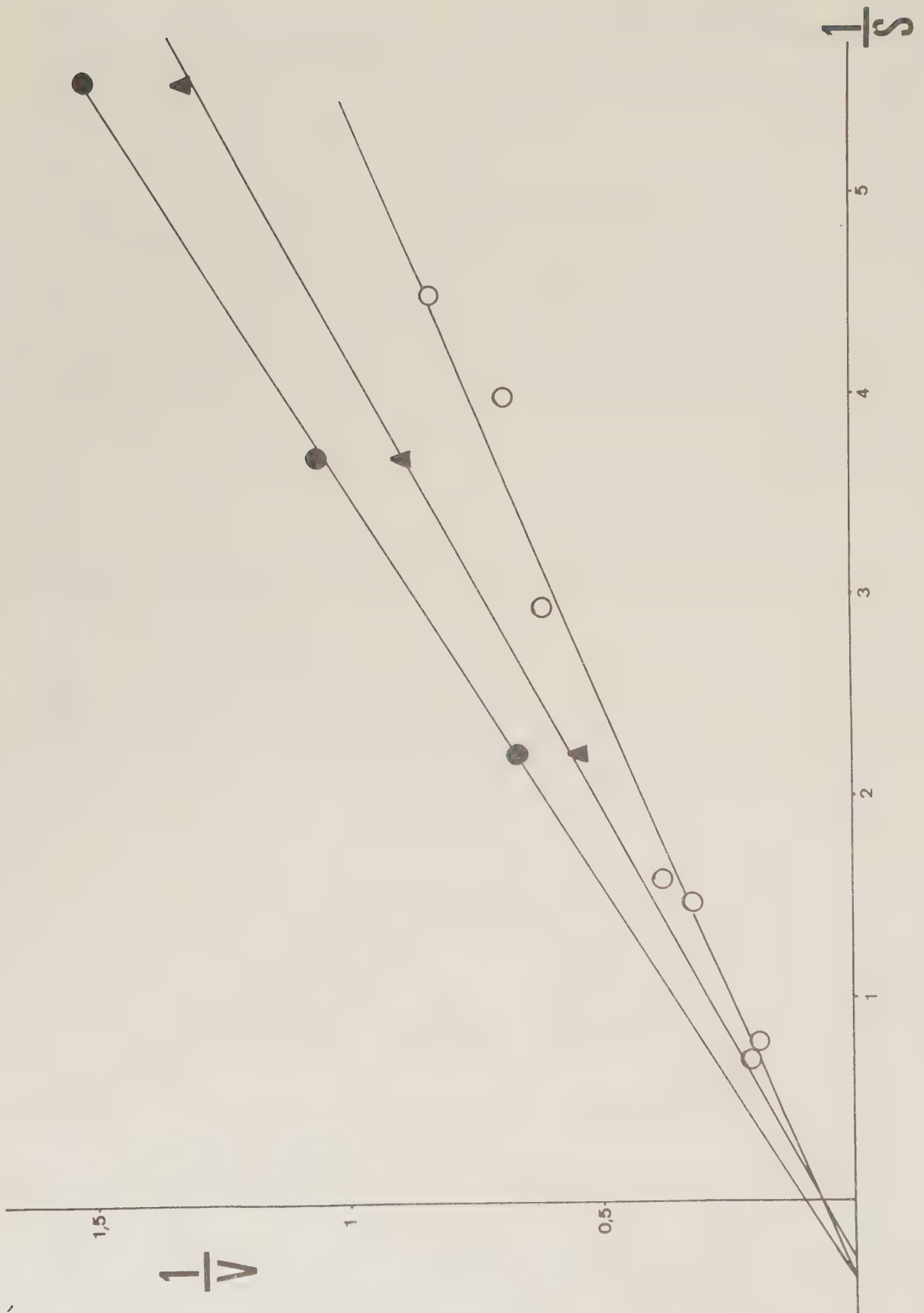
Figure 3 : Incorporation de phosphoryléthanolamine (^{14}C) en CDP-éthanolamine (^{14}C). Inhibitions par 1-AEP et 2-AEP.

- : sans inhibiteur.
- ▲- : inhibition compétitive par 2-AEP (15 mM),
- : inhibition non compétitive par 1-AEP (15 mM).

V est exprimé en nmoles de CDPE formées/min./mg de protéines.
S (mM) est la concentration en phosphoryléthanolamine dans le milieu d'incubation.

(page 114).





BIBLIOGRAPHIE

- 1 - R. DANA et L. DOUSTE-BLAZY
Bull. Soc. Chim. Biol., (1970) 52, 405.
- 2 - R. MAGET-DANA et L. DOUSTE-BLAZY
Experientia, (1971) 27, 1019.
- 3 - W.C. SCHNEIDER, W.G. FISCUS et J.B. LAWLER
Analyt. Biochem., (1966) 14, 121.
- 4 - G.B. ANSELL et T. CHOJNACKI
Biochem. J., (1966) 98, p. 303.
- 5 - C.R. LIANG et H. ROSENBERG
Biochim. Biophys. Acta, (1966) 125, 548.
- 6 - K.S. BJERVE
Biochim. Biophys. Acta, (1972) 270, 348.
- 7 - A.F. ROSENTHAL et S.C.H. HAN
Biochim. Biophys. Acta, (1970) 218, 213.
- 8 - P.P.M. BONSEN, G.H. de HAAS, W.A. PIETERSON et L.L.M. VAN DEENEN
Biochim. Biophys. Acta, (1972) 270, 364.
- 9 - A.F. ROSENTHAL et M. POUSADA
Biochim. Biophys. Acta, (1968) 164, 226.
- 10- A.F. ROSENTHAL, S.V. CHODSKY et S.C.H. HAN
Biochim. Biophys. Acta, (1969) 187, 385.

ADDENDA

PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DE CERTAINS PHOSPHONATES

I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les composés phosphonés sont présents surtout dans les organismes inférieurs et se rencontrent rarement chez les vertébrés : ceci peut laisser supposer que la liaison carbone-phosphore aurait progressivement disparu au cours de l'évolution animale.

Chez *Tetrahymena pyriformis*, Kennedy et Thompson (1) ont montré que les phosphonolipides étaient surtout localisés dans la membrane externe des cils vibratiles. Ils assureraient ainsi -grâce à leur résistance aux enzymes lipolytiques- un rôle de protection de la cellule (1, 2).

Des phosphonates interviennent dans de nombreux domaines de la physiologie animale et végétale. Nous avons tenté d'indiquer brièvement les propriétés de plusieurs dérivés phosphoniques.

*- Certains acides phosphoniques (en particulier les acides butyl-, p-nitrobenzyl-, p-nitrophényl-, benzyl- et phénylphosphonique) sont des inhibiteurs compétitifs de la phosphatase alcaline intestinale (3).

*- Le (1,1-diméthyl-3-oxobutyl) phosphonate est un hypothermique efficace, mais il est faiblement toxique (sa DL_{50} varie entre 440 et 3 200 mg/Kg) (4).

*- Action sur la coagulation

Dans les tests de coagulation sanguine *in vitro* l'analogue phosphonique de la phosphatidyléthanolamine a une activité plus importante que la phosphatidyléthanolamine elle-même (5). Les auteurs expliquent cet accroissement par une plus grande dispersion des molécules du phosphonolipide qui aurait ainsi une activité supérieure à la même concentration que le phospholipide.

Le diisopropylfluorophosphonate (DFP) (6) et certains orthophosphonates (7) sont des inhibiteurs de la libération de la sérotonine et des nucléotides plaquettaires, libération induite par la thrombine.

D'autre part, l'administration de fortes doses de DFP à des lapins prolonge la durée de vie des plaquettes (8).

*- Activité antiestérasiq

Plusieurs orthophosphonates sont des inhibiteurs de l'activité estérasi- que dans les membranes cellulaires (7). L'acide O,O-diméthyl 2,2,2, trichloro 1-hy- droxyéthylphosphonique provoque l'inhibition de la cholinestérase chez le cafard (9) et chez des larves d'insectes (en particulier *chilo plejadellus* et la mouche domes- tique) (10).

D'autre part, la réactivation de l'acétylcholinestérase est inhibée par des dérivés en para du phénylméthylphosphonochlorhydrate (11).

*- Insecticides

D'autres phosphonates sont employés comme insecticides (12). C'est le cas pour l'acide O,O-diméthyl 2,2,2, trichloro 1-hydroxyéthylphosphonique (13, 14). Si ce composé est injecté à des animaux (en particulier des alpagas) ayant des para- sites, il provoque l'inhibition de la cholinestérase érythrocytaire et est toxique à des doses supérieures à 260 mg/Kg (15).

Les sels de l'acide O-(aminoéthyl) phénylphosphonique sont également des insecticides. Ils sont -de plus- toxiques pour les rats, les souris et les hamsters (11).

*- Les phosphonates et le métabolisme du calcium

Fleisch et ses collaborateurs se sont spécialisés dans l'étude de l'ac- tion des phosphonates sur le métabolisme du calcium (16).

Certains diphosphonates empêchent la formation *in vitro* de cristaux de phosphate de calcium et *in vivo* la calcification de l'aorte et des reins, d'autres inhibent la résorption osseuse (17 - 19). Ils inhibent également l'ostéoporose in- duite par immobilisation de la patte arrière chez le rat (20).

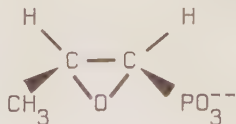
L'éthane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (E.H.P.D.) et le dichlorométhylène diphosphonate (Cl_2 MPD) agissent sur la calcification et la résorption du cartilage et de l'os du tibia chez le rat (21). Orimo *et coll.* (22) ont montré qu'après inje- ction sous-cutanée de méthylène diphosphonate de sodium à des rats, le taux de cal- cium dans le sérum diminue rapidement mais, 40 minutes plus tard, il est plus élevé qu'avant le traitement.

Bonjour *et coll.* (23) ont obtenu des résultats intéressants en ce qui concerne l'absorption intestinale du calcium chez des rats traités par des diphos- phonates.

Les monophosphonates n'ont aucun effet sur le métabolisme du calcium (24).

*- Phosphonates antibiotiques

Un antibiotique, possédant une liaison C-P et produit par des souches de *Streptomyces* (25) a été isolé à l'état cristallin de bouillons de culture fer- mentés (26) : c'est l'acide (-) (cis-1,2 époxy-méthyl) phosphonique, appelé phospho- nomycine (23 155-02-4), et dont la formule est la suivante:



Cet antibiotique interrompt la lyse cellulaire de certaines bactéries (27).

Un autre phosphonate : l'acide 1-aminoéthylphosphonique est un inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire chez *Escherichia coli* et *Vibrio parvulus* ; son action est différente de celle de la phosphonomycine (28).

La phosphonomycine est très active contre les infections à *Staphylococcus aureus* (29-35), *Escherichia coli* (30, 36), *Pseudomonas aeruginosa* (36) et méningocoques (37).

Récemment, on a cependant isolé un mutant d'*E. coli* K 12 résistant à la phosphonomycine (38).

Martin *et coll.* (35) ont montré que plusieurs souches de *Ps. aeruginosa* résistent à tous les antibiotiques sauf à la phosphonomycine qui est, par ailleurs, meilleur que l'érythromycine contre les staphylocoques. Ces mêmes auteurs (39) ont combiné la phosphonomycine avec plusieurs autres antibiotiques (dont ampicilline, chloramphénicol et érythromycine) et n'ont observé aucun antagonisme.

L'activité de la phosphonomycine contre *Staphylococcus aureus* est augmentée en présence de protéines dermiques ou épidermiques (40) ou de γ -globulines humaines (41). C'est un antibiotique relativement peu toxique (29). Administré par voie intraveineuse chez l'homme, 57 à 75 % de la dose est excrétée dans les urines et on n'observe aucun résultat anormal en ce qui concerne l'hématocrite, la numération globulaire, l'urée sanguine et la bilirubine plasmatique (42). D'autre part, il y a peu d'effets cumulatifs après des doses répétées (43).

Par contre, l'absorption orale du sel de calcium de la phosphonomycine peut provoquer quelques troubles gastrointestinaux après ingestions successives (44).

Dans la fermentation produite par *Streptomyces* on trouve de l'acide (-)-(cis-1,2 époxypropyl) phosphonique qui est aussi un antibiotique efficace contre les sources pathogènes de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella* et *Proteus* (45, 46).

Par contre, un autre phosphonate : le 1-hydroxyéthane -1,1-diphosphonate favorise la croissance de plusieurs souches de streptocoques de la plaque dentaire (47).

*- Phosphonates régulateurs de la croissance des plantes

L'acide phosphonoéthylphosphonique et ses dérivés ont des effets sur la croissance des plantes : en particulier ils accélèrent la défoliation et la floraison (48).

L'acide (2-chloroéthyl) phosphonique (appelé *Ethrel* ou *Etephon*) possède des propriétés comparables (49). Il active la maturation des fruits (50-61) : Rabinovitch *et coll.* (51) ont montré que si des melons sont immergés dans une solution d'*Ethrel* (à 4 000 ppm) 100 % arrivent à maturité en 6 jours ; il en est de même pour les tomates (51, 54, 58), les raisins -après vaporisation d'une solution d'*Ethrel* (52)-, les pommes et les cerises (61), les patates douces (56).

D'après Martin *et coll.* (62), l'*Ethrel* est absorbé et métabolisé rapidement dans les jeunes plantes.

D'autre part, l'*Ethrel* stimule la formation des fleurs femelles chez le melon d'eau (60).

Un autre phosphonate (Et-H₁-propylphosphonate) appliqué à des plants mâles de *Cannabis sativa* à 16 000 et 24 000 ppm, retarde la croissance et entraîne une malformation des feuilles et la formation de fleurs femelles et intersexuées (63).

D'autres phosphonates - les aminoalkyl-, O,O dialkyl- et O,O-diarylphosphonates - sont des herbicides (64).

Si ces divers composés sont commercialisés et utilisés soit comme insecticides, soit comme antibiotiques, soit dans le traitement des primeurs, s'ajoutant aux dégustations d'huîtres et crustacés - sources d'AEP (65) - il n'y a peut-être pas lieu de s'étonner de trouver des traces de phosphonates dans les tissus humains (66).

II - L'ACIDE 2-AMINOETHYLPHOSPHONIQUE ET L'AGREGATION PLAQUETTAIRE

En collaboration avec Hugues CHAP

Certains phosphonates agissant sur la libération des nucléotides plaquettaires (6, 7) et sur la durée de vie des plaquettes (8), nous avons étudié l'action de l'AEP sur l'agrégation plaquettaire à la thrombine et son incorporation dans les lipides plaquettaires.

MATERIEL ET METHODES

1 - Plaquettes sanguines

- Préparation de la suspension plaquettaire

Le sang de sujets normaux (donneurs du Centre de Transfusion Sanguine) est recueilli sur le mélange ACD d'Aster et Jandl (67). La suspension plaquettaire est préparée selon la méthode de Ardlie *et coll.* (68). En fin d'opération, les plaquettes sont suspendues dans du tampon Tyrode ajusté à pH 7,35 avec HCl et dont la composition pour 1 litre est la suivante : solution d'albumine bovine à 30 % : 11,6 ml ; glucose anhydre : 1 g ; MgCl₂ : 0,1 g ; CaCl₂, 2H₂O : 0,294 g.

Les cellules sont comptées sur cellule de Malassez après prélèvement sur Unopette (Becton-Dickinson, Rutherford - New Jersey).

- Mesures d'agrégation plaquettaire

Elles se font à 37°C sous agitation par un barreau magnétique. L'agrégation plaquettaire est mesurée par turbidimétrie à 600 nm (69) ; elle est suivie en continu grâce à un enregistreur Philips.

Les effecteurs sont en solution dans un tampon Tyrode. Le volume de la suspension plaquettaire est de 0,4 ml et le volume total dans la cuve de l'agrégomètre : 0,5 ml. La concentration finale de la thrombine -agent agrégant- est de 0,2 Unité/ml ; AEP, phosphoryléthanolamine, phosphorylsérine ou phosphorylcholine sont ajoutés à la concentration de 10⁻²M.

Pour de plus amples détails concernant ces techniques, on se reportera aux travaux de Chap (70).

2 - Préparation de 2-AEP (^{32}P)

Voir page 32.

3 - Incubation et extraction des lipides plaquettaires

Pour étudier l'incorporation de l'AEP dans les plaquettes, 3 ml de suspension plaquettaire ($1.080.000$ plaquettes/ mm^3) sont mises à incuber 1 h à 37°C avec 2-AEP (^{32}P) (5 mM, $3.280.000$ dpm) dissous dans 0,3 ml de tampon Tyrode.

A la fin de l'incubation on centrifuge à $6\,000\text{ g} \times 2\text{ min.}$. Le surnageant est aspiré et le culot plaquettaire lavé 3 fois par 7 ml de tampon Tyrode (le comptage de la dernière solution de lavage indique une radioactivité nulle).

Les lipides sont extraits du culot plaquettaire par la méthode de Folch (71). L'extrait lipidique est lavé par le mélange chloroforme-méthanol-eau 3:47:48 par vol. jusqu'à ce que la solution de lavage ait une radioactivité nulle.

La radioactivité est déterminée par scintillation en milieu liquide (compteur Packard-Tricarb 3320).

RESULTATS ET DISCUSSION

1 - L'AEP traverse la membrane plaquettaire (environ $17\text{ nmoles}/10^6$ plaquettes) et s'incorpore dans les lipides (Tableau 1). Nous avons traité la fraction hydrosoluble par du charbon actif (Norit) pour savoir si l'AEP était lié ou non à un composé nucléotidique, mais nous avons trouvé plus de 98 % d'AEP libre.

TABEAU 1 : Incorporation de 2-AEP (^{32}P) dans les plaquettes sanguines

Incorporation de l'AEP		
	dpm	nmoles d'AEP/ 10^6 plaquettes
Lipides	1950	3,4
Fraction hydrosoluble	7650	13,6

2 - L'AEP ainsi que les phosphoryléthanolamine, -sérine et -choline) n'est pas un agent agrégant ; par contre il inhibe partiellement l'agrégation plaquettaire à la thrombine (Fig. 1).

C'est un inhibiteur moins actif que la phosphoryléthanolamine et la phosphorylsérine qui, à la même concentration (10^{-2}M), inhibent totalement l'agrégation (Fig. 2) alors que la phosphorylcholine n'a au contraire, aucune action (Fig.3).

L'activité inhibitrice de l'AEP est fonction de sa concentration finale.

Nous mesurons sur les courbes d'agrégation, les paramètres définis par Chap (70) dans son étude de l'agrégation plaquettaire à la phospholipase C : la pente de la tangente au point d'inflexion (vitesse maximale d'agrégation) et le temps de latence (TL).

Nous constatons (Fig. 1) que si la concentration en AEP passe de $2 \times 10^{-3}\text{M}$ à 10^{-2}M , le temps de latence varie de 1 min. à 2 min. alors qu'il est de 0,6 min. en l'absence d'AEP ; quant à la vitesse maximale d'agrégation elle est diminuée de moitié.

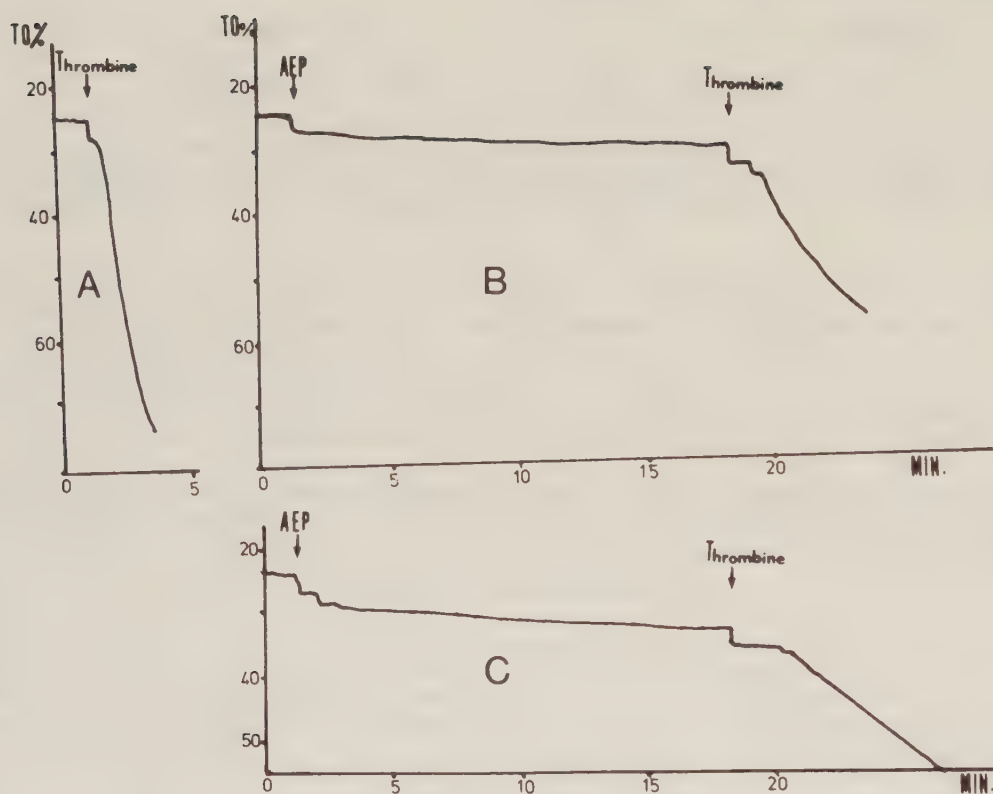


FIGURE 1 : Action de l'AEP sur l'agrégation plaquettaire à la thrombine.

A : agrégation plaquettaire à la thrombine (0,2 Unité/ml) ;

B : concentration en AEP : 2×10^{-3} M ;

C : concentration en AEP : 10^{-2} M.

L'inhibition de l'agrégation plaquettaire à la thrombine augmente avec la durée d'incubation avec AEP (phosphoryléthanolamine et phosphorylsérine), mais ce phénomène n'est pas nécessairement une conséquence de l'incorporation de l'AEP dans les plaquettes. Il peut être dû à une inactivation de la thrombine ou à une perte de réactivité des plaquettes au cours du temps.

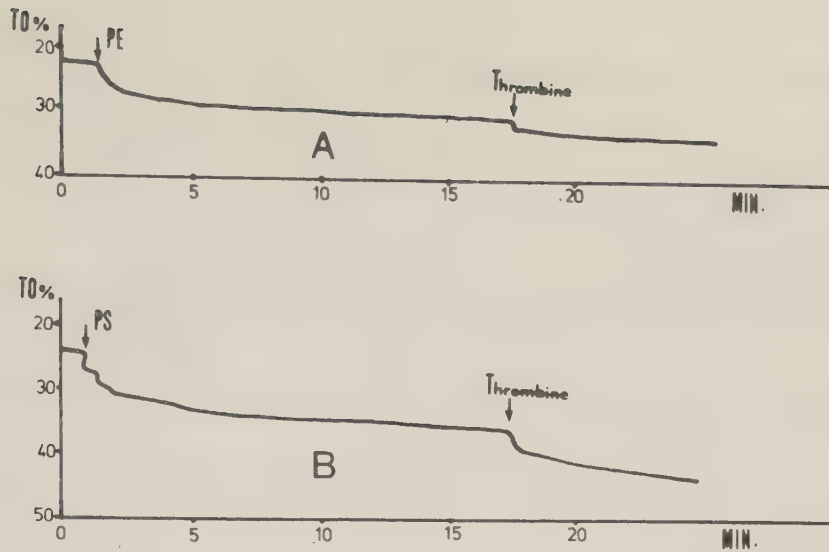


FIGURE 2 : Action de la phosphoryléthanolamine et de la phosphorylsérine sur l'agrégation plaquettaire à la thrombine.

A : courbe d'agrégation en présence de phosphoryléthanolamine ($10^{-2}M$)

B : courbe d'agrégation en présence de phosphorylsérine ($10^{-2}M$)

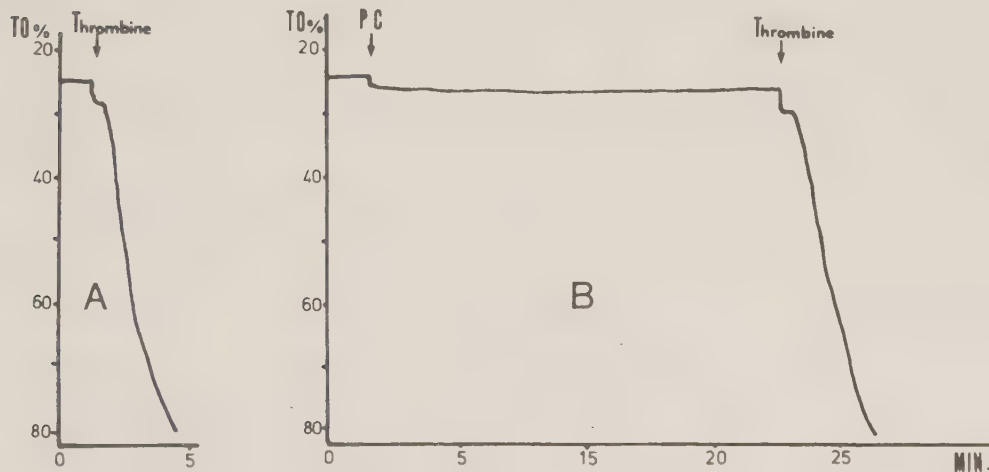


FIGURE 3 : Agrégation plaquettaire à la thrombine en présence de phosphorylcholine.

A : agrégation plaquettaire à la thrombine (0,2 Unité/ml)

B : concentration en phosphorylcholine : $10^{-2}M$.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - K.E. KENNEDY et G.A. THOMPSON Jr.
Science (1970) 168, 989.
- 2 - J.S. KITTREDGE et E. ROBERTS
Science (1969) 164, 37.
- 3 - M. KOCHMAN, P. MASTAHERZ et E. WOLNA
Arch. Immunol. Therap. Exptl. (1964) 12, 106.
- 4 - R.S. GARAEV et I.A. STUDENTSOVA
Farmakol. Toksikol. (Moscou) (1970) 33, 237.
- 5 - D.L. TURNER, M.J. SILVER, R.R. HOLBURN, E. BACZYNSKI et A. BROOKER BROWN
Lipids (1968) 3, 234.
- 6 - J.F. MUSTARD, M.A. PACKHAM et A. SENYI
J. Lab. Clin. Med. (1967) 70, 1003.
- 7 - P.A. WARD et E.L. BECKER
J. Exp. Med. (1967) 125, 1001.
- 8 - Y. CHANG
Blood (1967) 29, 891.
- 9 - T. MIHATA, K. IYATOMI, T. SAITO et O. MORIKAWA
Nippon Oyo Dubutsu Konchu Gakkai-Shi (1968) 12, 211.
- 10- K. SATO et T. SAITO
Nippon Oyo Dubutsu Konchu Gakkai-Shi (1968) 12, 1948.
- 11- W.J. HOVANEC et C.N. LIESKE
Biochemistry (1972) 11, 1051.
- 12- Z. SCHNAIDER et M. PARTYKA
Sylvan (Pol.) (1969) 113, 1.
- 13- O. LANNG
Dan. 115, 673 (cl. A 01n) 16 Mar. 1970, Appl. 24 Mai 1967.
- 14- J. DUDAS *et coll.*
Hung. 157, 537 (cl. A 01n) 06 Juin 1970, Appl. 23 Avril 1968.
- 15- A.P. VALLENAS, J. OCHOA et C. GUERRERO
Rev. Fac. Med. Vet. Univ. Nacl. Mayor San Marcos (1961-1962) 16-17, 69-78.
- 16- H. FLEISCH, S. BISAZ, A.D. CARE, R.C. MUEHLBAUER et R.G.G. RUSSEL
Calcitonin, Proc. Int. Symp. 2nd 1969 (Pub 1970) 409.
- 17- J.J. REYNOLDS, C. MINKIN, D.B. MORGAN, D. SPYCHER et H. FLEISCH
Calcif. Tissue Res. (1972) 10, 302
- 18- J.J. REYNOLDS, H. MURPHY, R.C. MUEHLBAUER, D.B. MORGAN et H. FLEISCH
Calcif. Tissue Res. (1973) 12, 59.

- 19- R.G.G. RUSSEL, A.M. KISLIG, P.A. CASEY, H. FLEISCH, J. THORTON, R. SCHENK et D.A. WILLIAMS
Calcif. Tissue Res. (1973) 11, 179.
- 20- R.C. MUEHLBAUER, R.G.G. RUSSEL, D.A. WILLIAMS et H. FLEISCH
Eur. J. Clin. Invest. (1971) 1, 336
- 21- R. SCHENK, W.A. MERZ, R. MUEHLBAUER, R.G.G. RUSSEL et H. FLEISCH
Calcif. Tissue Res. (1973) 11, 196.
- 22- O. ORIMO, M. OHATA et T. JUJITA
Igaku No Ayumi (Japan) (1970) 75, 313.
- 23- J.P. BONJOUR, R.G.G. RUSSEL, D.B. MORGAN et H.A. FLEISCH
Amer. J. Physiol. (1973) 224, 1011.
- 24- H. FLEISCH, R.G.G. RUSSEL, S. BISAZ, R.C. MUEHLBAUER et D.H. WILLIAMS
Eur. J. Clin. Invest. (1970) 1, 12.
- 25- D. HENDLIN *et coll.*
Science (1969) 166, 122.
- 26- L. CHAIET, T.W. MILLER, R.T. GOEGELMAN, J.A. KEMPF et J.F. WOLF
J. Antibiot. (1970) 23, 336.
- 27- A. TOMASZ, A. ANTHONY et E. ZANATI
Nature (1970) 227, 138.
- 28- E.L. DULANEY
J. Antibiot. (1970) 23, 567.
- 29- A.K. MILLER, B.M. FROST, M.E. VALIANT, H. KROPP et D. HENDLIN
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 (Pub. 1970), 310.
- 30- D.G. KESTLE et W.M.M. KIRBY
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 (Pub. 1970), 332.
- 31- D. HENDLIN *et coll.*
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 (Pub. 1970), 297.
- 32- S.B. ZIMMERMAN, E.O. STAPLEY, H. WALLICK et R. BALDWIN
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 (Pub. 1970), 303.
- 33- H. CLARK, N.K. BROWN, J.F. WALLACE et M. TURCK
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 (Pub. 1970), 338.
- 34- J.W. SMITH et J.P. SANFORD
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 (Pub. 1970), 346.
- 35- I. MARTIN, S. MOCHALES, S. HERNANDEZ et J. MATA-MARTINEZ
Ann. Inst. Farmacol., 1968-1969, (Pub. 1970), 17-18, 453.
- 36- M. MORENO-LOPEZ, D. DAMASO, E.J. PEREA, A.S. SOUSA, M.L. MARTINEZ et L.M. MARCO
Microbiol. Espan. (1971) 24, 79.
- 37- E. SANDERS et W.B. DEAL
Antimicrob. Ag. Chem. 1970 (Pub. 1971) 205.

- 38- P.S. VENKATESWARAN et H.C. WU
J. Bacteriol. (1972) 110, 935.
- 39- I. MARTIN, S. MOCHALES, S. HERNANDEZ, A. RODRIGUEZ et J. MATA
Ann. Inst. Farmacol. Espan. 1970 (Pub. 1971) 19, 341.
- 40- W. RAAB et J. WINDISCH
Arch. Dermatol. Forsch. (1973) 246, 27.
- 41- W. RAAB et J. WINDISCH
Pathol. Microbiol. (1971) 37, 368.
- 42- A. RODRIGUEZ, A. GALLEG0, J.M. RUBIO et T. OLAY
An. Inst. Farmacol. Espan. 1971 (Pub. 1972) 20, 419.
- 43- E.L. FOLTZ, et H. WALLICK.
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 (Pub. 1970) 316.
- 44- E.L. FOLTZ, H. WALLICK et C. ROSENBLUM
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 (Pub. 1970) 322.
- 45- A.L. DEMAINE, F.R. WHITE et L.D. SCHNABLE
Fr. Demande 2,028,973. (Cl.C.12d,c 07 f) 20 Nov. 1970 U.S. Appl. 23 Janv. 1969.
- 46- E.O. STAPLEY et M. JACKSON
Fr. Demande 2,025,455. (Cl.C.12d) 16 oct. 1970, U.S. Appl. 05 Déc. 1968.
- 47- B. GUGGENHEIM
Helv. Odont. Acta (1970) 14, 45.
- 48- C.D. FRITZ
S. African 6,801,036 15 Jan. 1969, U.S. Appl. 23 Feb. 1967-27 Déc. 1967.
- 49- O.M. VAN ANDEL
Naturwissenschaften (1970) 57, 396.
- 50- J.C. CRANE, N. MAREI et M.M. NELSON
J. Am. Soc. Hort. Sci. (1970) 95, 367.
- 51- H.D. RABINOVITCH, J. RUDICH et N. KEDAR
Israel J. Agr. Res. (1970) 20, 47.
- 52- W.J. CLORE et R.R. FAY
Hort. Science (1970) 5, 21.
- 53- A. CHROMINSKI et A. KAMIENSKA
Postepy Nauk. Poln. (1969) 16, 43.
- 54- S. IWAHORI et J.M. LYONS
Am. Soc. Hort. Sci. (1970) 95, 88.
- 55- C. NITSCH et J.P. NITSCH
Plant. Physiol. (1969) 44, 1747.
- 56- D.R. TOMPKINS et J.L. BOWERS
Hort. Science (1970) 5, 84.
- 57- M.G. STEPHENSON, J.P. GAINES et W.C. HAMMOND
Tob. Sci. (1971) 15, 43.

- 58- H.C. DOSTAL et G.E. WILCOX
J. Am. Soc. Hort. Sci. (1971) 96, 656.
- 59- A. PETROV
Zemledelie (1971) 33, 52.
- 60- O.S. SINGH et S.K. MADAN
Sci. Cult. (1971) 37, 522.
- 61- L.J. EDGERTON et A.H. HATCH
J. Amer. Soc. Hort. Sci. (1971) 96, 656.
- 62- G.C. MARTIN, H.A. ABDEL-GAWAD et R.J. WEAVER
J. Amer. Soc. Hort. Sci. (1972) 97, 51.
- 63- N.Y.M. RAM et V.S. JAISWAL
Z. Pflanzenphysiol. (1972), 68, 181.
- 64- E. GUENTHER, W. KOCHMANN, W. LOETTGE, T. ROETHLING et A. CREUZBURG
Ger. Offen. 2,151,460 (Cl.A.01 n, c 07 f) 29 Mar. 1973, Ger.(East) Appl. W.P.
155,788 15 Jun. 1971.
- 65- L.D. QUIN
Science (1964) 144, 1133.
- 66- J.A. ALHADEFF et G.D. DAVES Jr.
Biochemistry (1970) 9, 48.
- 67- R.H. ASTER et J.H. JANDL
J. Clin. Invest. (1964) 43, 843.
- 68- N.G. ARDLIE, M.A. PACKHAM et J.F. MUSTARD
Brit. J. Haemat. (1970) 19, 7.
- 69- G.V.R. BORN
Nature (1962) 194, 927.
- 70- H. CHAP
Thèse Méd., Toulouse 1973.
- 71- J. FOLCH, M. LEES et C.H. SLOANE-STANLEY
J. Biol. Chem. (1957) 226, 497.

EN CONCLUSION ...

... nous avons mis en évidence, dans le foie de rat :

* Une inhibition de la biosynthèse des phospholipides par l'acide 2-amino-éthylphosphonique.

Cette inhibition s'exerce à plusieurs étapes du métabolisme phospholipidique, en particulier :

- sur la décarboxylation de la phosphatidylsérine ;
- sur l'échange de bases entre phosphatidyléthanolamine et sérine (inhibition non compétitive) ;
- sur la formation de CDP-éthanolamine à partir de phosphoryléthanolamine (inhibition compétitive).

* L'incorporation de l'acide 2-aminoéthylphosphonique dans les lipides par les mêmes voies métaboliques que son analogue : la phosphoryléthanolamine. 2-AEP est, en effet, un substrat pour la PE-cytidyltransférase ; il se forme CMP-AEP qui a été identifié après des incorporations de 2-AEP (^{32}P) *in vivo* et *in vitro*.

La voie de biosynthèse des phosphonolipides est donc :



* La biosynthèse *de novo* de la liaison carbone-phosphore après injection intrapéritonéale de phosphate (^{32}P) à des jeunes rats.

Autorisation de Soutenance accordée

TOULOUSE, le 01 AVR. 1974

Le Président
de l'Université PAUL-SABATIER,



L. LARENG

